



#10

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, the undersigned Masaaki Iwabuchi, translator, having an office at Abe, Ikubo & Katayama, 2-8-7, Yaesu, Chuo-ku, Tokyo, Japan, declare that I am well acquainted with the Japanese and English languages, and that the attached English text is, to the best of my knowledge, a complete and accurate translation from the Japanese text of the priority document, Japanese Patent Application No.11 (1999)-55326 (Ref. No. 99028) dated March 3, 1999.

The undersigned further declares that all statements made herein of his/her own knowledge are true, and all statements made on information and belief are believed to be true, and that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like, so made, are punishable by fine and/or imprisonment under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that any such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent resulting therefrom.

Date: February 13, 2002

  
Signature of Translator

Masaaki Iwabuchi  
Printed Name of Translator



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

09/857815  
PCT/JP 99/06873

08.12.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 04 FEB 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 3月 3日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第055326号

出願人

Applicant (s):

武田薬品工業株式会社

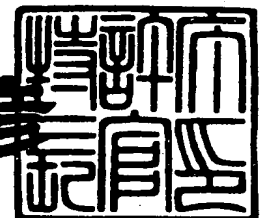
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3094740

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 A99028  
 【提出日】 平成11年 3月 3日  
 【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/12  
 C07K 13/00

【発明の名称】 ベータセルリン改変分子  
 【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市左京区下鴨宮崎町 6 6 番地の 3

【氏名】 五十嵐 貢一

【発明者】

【住所又は居所】 京都府長岡京市天神 4 丁目 6 番 8 号

【氏名】 佐々田 玲子

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ベータセルリン改変分子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ベータセルリンの N 末端の 1 ないし 30 個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C 末端から第 22 番目のアミノ酸残基と第 23 番目のアミノ酸残基との間に 1 ないし 5 個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子またはその塩。

【請求項 2】 ベータセルリンの N 末端の 1 ないし 30 個のアミノ酸残基が欠失した請求項 1 記載のベータセルリン改変分子またはその塩。

【請求項 3】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のベータセルリン改変分子またはその塩。

【請求項 4】 配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有するベータセルリン改変分子またはその塩。

【請求項 5】 請求項 1 または 4 記載のベータセルリン改変分子をコードする DNA を含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ベータセルリン改変分子を生成せしめることを特徴とする請求項 1 または 4 記載のベータセルリン改変分子またはその塩の製造法。

【請求項 6】 請求項 1 または 4 記載のベータセルリン改変分子またはその塩を含有してなる医薬組成物。

【請求項 7】 医薬組成物が糖尿病予防・治療薬である請求項 6 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ベータセルリン（以下、BTC と略称することがある）改変分子、それをコードする DNA、改変分子の製造法、それらの用途に関する。

【0002】

【従来技術】

ベータセルリン（Betacellulin：BTC）は、マウス BTC-3 インスリン- $\alpha$  細胞の培養上清から単離、精製された細胞成長因子である（サイエンス、25

9巻、1604頁、1993年)。マウスBTCは、まず177アミノ酸残基からなる膜結合型のプレプロ分子(前駆体)として合成された後、プロセッシングを受けて80アミノ酸残基の成熟分子となり分泌される。ヒトBTCは188残基からなる膜結合型の前駆体として合成された後、同様にプロセッシングを受けて80アミノ酸残基の成熟分子となり分泌される。アミノ末端(N末)30アミノ酸残基からなる配列は、他のタンパクのアミノ酸配列と全く相同性を示さないが、カルボキシル末端(C末)の50アミノ酸残基からなる配列は、上皮成長因子(Epidermal Growth Factor: EGF)ファミリーの各メンバー間で保存されている6個のシステイン残基を含む配列と相同性が高く、BTCはEGFファミリーの一員として数えられている。生体内に存在するベータセルリンは極めて微量で、これを取得するのは困難であったが、遺伝子組換え技術を用いた製造法が特開平6-87894号公報などに記載されている。

ベータセルリンはEGFと同様、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、網膜色素上皮細胞などに対する増殖促進活性を有している(サイエンス 259巻、1604頁、1993年)。また、<sup>125</sup>IラベルしたベータセルリンがEGFレセプターに結合すること(ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー 269巻、9966頁、1994年)、ベータセルリンの細胞増殖促進活性がEGFレセプターに対する抗体で阻害されること(バイオロジカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション 190巻、1173頁、1993年)が報告されている。これらの結果は、BTCが細胞増殖促進活性、即ち細胞のDNA合成誘導活性を発揮するのにEGFレセプターを介したシグナル伝達に関与していることを示唆する。

#### 【0003】

一方、ベータセルリンは細胞増殖促進活性以外に膵外分泌系細胞を内分泌系β細胞へ分化誘導する活性を持つことが報告されている。ラット膵管細胞腫瘍由来の細胞株AR42JのサブクローンであるAR42J-B20株は、エキソクリンとニューロエンドクリン細胞の両方の性質を示す細胞である(アメリカン ジャーナル オブ フィジオロジー 266巻、G963頁、1994年)。この細胞をアクチビンA存在下でBTCを添加して培養すると、インスリン産生細胞に分化する(ジャーナル オブ クリニカル インベスティゲイション 97巻、1647頁、1996年)。

この分化誘導活性は、同じ濃度の EGF あるいは Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) では認められないことから、ベータセルリンは、EGF レセプターとは異なる別のレセプターを介して  $\beta$  細胞への分化誘導活性を発揮すると考えられている。

このようなベータセルリンの膵  $\beta$  細胞への分化誘導活性は、糖尿病、特に膵  $\beta$  細胞の破壊性病変が成因である I 型糖尿病の治療に有効である。実験的には、アロキサン部分灌流糖尿病モデルマウスにベータセルリンを皮下投与すると、部分的に膵  $\beta$  細胞の新生／再生像が観察され、耐糖能が改善されることが分っている (1998 年日本糖尿病学会 講演要旨集、125)。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、ベータセルリンを実際に生体に投与する際に以下の二つの問題点がある。第一の問題点は、前述の細胞増殖刺激活性 (EGF 活性) である。このベータセルリンが有する EGF 活性が膵臓以外の組織、器官の広範な細胞に及ぼす影響が副作用につながる恐れがある。第二の問題点は、EGF レセプターに対する親和性である。ベータセルリンの *in vivo* 投与後の体内動態を考えた時、投与分子の大部分が血管や膵臓以外の臓器における EGF レセプターに結合し消費されるため、膵臓に薬効を示すには相対的にベータセルリンの投与量が増大する可能性がある。

以上の問題点を解決し、ベータセルリンを新しい糖尿病治療薬として応用するために、膵  $\beta$  細胞への分化誘導活性は保持し EGF レセプターへの結合能を欠くベータセルリンの改変分子を作出することが望まれている。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、80 アミノ酸残基の成熟体と同等の 3T3 に対する DNA 合成誘導活性および分化誘導活性を示す C 末 50 アミノ酸残基型分子 (BTC50) (ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー 269 巻、9966 頁、1994 年) のアミノ酸配列の一部にアミノ酸を付加または挿入する、あるいは他のアミノ酸で置換することにより、ベータセルリンの改変分子を種々調製し、その生物活性



を調べ、膵臓β細胞への分化促進活性を保持したままEGFレセプターへの結合能を欠くようなベータセルリン改変分子を初めて見出し、さらに研究を続けた結果、本発明を完成させた。

【0006】

すなわち、本発明は、

(1) ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子またはその塩；

(2) ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失した前記(1)記載のベータセルリン改変分子またはその塩；

(3) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する前記(1)記載のベータセルリン改変分子またはその塩；

(4) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するベータセルリン改変分子またはその塩；

(5) 前記(1)または(4)記載のベータセルリン改変分子をコードするDNAを含有する組換えベクターで形質転換された形質転換体を培養し、該ベータセルリン改変分子を生成せしめることを特徴とする前記(1)または(4)記載のベータセルリン改変分子またはその塩の製造法；

(6) 前記(1)または(4)記載のベータセルリン改変分子またはその塩を含有してなる医薬組成物；

(7) 医薬組成物が糖尿病予防・治療薬である前記(6)記載の組成物等に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明のベータセルリン改変分子(ベータセルリンムテイン)は、上述のとおり、ベータセルリンの膵臓β細胞への分化促進活性(BTC活性)を保持したまま、EGF活性が減弱されている。

本発明の「ベータセルリン改変分子」は、BTC活性を保持したまま、EGF

活性が減弱されたベータセルリン改変分子であればよく、例えば、(1) ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子またはその塩、(2) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するベータセルリン改変分子またはその塩などが挙げられる。

本発明の「ベータセルリン改変分子」の「ベータセルリン」は、Sasadaら；バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.) , 190巻, 1173頁、1993年に記載の、Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr (配列番号：3) で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。

上記「アミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子」の「アミノ酸残基の挿入」は、ベータセルリンを生体内に投与した際に抗原性の問題が生じない程度の挿入であればよく、特にアミノ酸残基の種類またはペプチド鎖は問わない。該「アミノ酸」の具体例としては、非極性（疎水性）アミノ酸（例、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなど）、極性（中性）アミノ酸（例、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなど）、陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸（例、アルギニン、リジン、ヒスチジンなど）、負電荷をもつ（酸性）アミノ酸（例、アスパラギン酸、グルタミン酸など）などがあげられる。アスパラギン、プロリン、セリンが好ましい。該「ペプチド鎖」としては、上記「アミノ酸」が2ないし5個結合してなるペプチド鎖のことをいい、好ましくは2ないし4個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖などがあげられる。

【0008】

「N末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよいベータセルリ

ン」としては、たとえば (1) 上記配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、(2) N末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失したベータセルリン改変分子、(3) ベータセルリンのN末端の第1番目から第30番目のアミノ酸配列中にアミノ酸残基（例、1ないし5個のアミノ酸残基）が挿入されたベータセルリン改変分子などが含まれる。

該「N末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失したベータセルリン改変分子」には、(1) ベータセルリンのN末端側の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失したもの、(2) ベータセルリンのN末端側の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失し、アミノ酸残基（例、1ないし5個のアミノ酸残基）が付加したものなどが含まれる。

【0009】

「ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基（すなわち、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列のN末端から第58番目のアミノ酸残基：Gln）と第23番目のアミノ酸残基（すなわち、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列のN末端から第59番目のアミノ酸残基：Thr）との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子」は、ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基のどの部分のアミノ酸が欠失していてもよい、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子であればよく、具体例としては、

(1) Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr（配列番号：4）で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリン改変分子、

(2) ベータセルリンのN末端から1ないし30番目までのアミノ酸残基（Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys）が欠失していて、かつ

C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子、例えば、Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr (配列番号: 1) で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリン改変分子などがあげられる。

本発明の「ベータセルリン改変分子」として、好ましくは、配列番号: 1または配列番号: 2で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリン改変分子などがあげられる。

#### 【0010】

本明細書におけるベータセルリン改変分子は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。また、ベータセルリン改変分子は、通常、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

Rとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル、もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキルなどの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基、ピバロイルオキシメチル基などがあげられる。

本発明のベータセルリン改変分子の塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）、酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸等）との塩、有機酸（例、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸等）との塩などが用いられる。

【0011】

本発明のベータセルリン改変分子は、自体公知の方法、例えば、特開平6-87894号公報に記載の方法またはそれに準じた方法、後述のペプチド合成法、または後述のベータセルリン改変分子をコードするDNAを含有する形質転換体を培養する方法などにより製造することができる。

ペプチド合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のベータセルリン改変分子を構成し得る部分ペプチドまたはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のベータセルリン改変分子を製造することができる。公知の縮合方法および保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②Schroeder および Luebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

反応後は通常の精製法、例えば溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明のベータセルリン改変分子を精製単離することができる。上記方法で得られるベータセルリン改変分子が遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0012】

ベータセルリン改変分子のアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることにより製造できる。該樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂

、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。該樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護されたアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、必要に応じて高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的とするアミド体を取得する。

上記の保護されたアミノ酸の縮合は、ペプチド合成に使用できる縮合剤を用いる。該縮合剤としては、カルボジイミド類(例、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなど)などが挙げられる。かかる縮合の方法としては、①縮合剤、ラセミ化抑制添加剤(例、HOBt、HOObtなど)および保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加する方法、または、②あらかじめ保護されたアミノ酸をその混合酸無水物、HOBtエステルまたはHOObtエステルとした後、樹脂に対して約1.5ないし4倍当量、樹脂に添加する方法などが挙げられる。該縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択され、例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類またはこれら二種以上の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分

な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

### 【0013】

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、例えば、C<sub>1-6</sub>アルキル基（例、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなど）、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル基（例、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）、C<sub>7-14</sub>アラルキル基（例、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル、 $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキルなど）、2-アダマンチル基、4-ニトロベンジル基、4-メトキシベンジル基、4-クロロベンジル基、フェナシル基、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド基、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド基、トリチルヒドラジド基などが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。該エステル化に適する基としては、例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。該エーテル化に適する基としては、例えばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル基、Br-Z、ターシャリーブチル基などが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル基、DNP、ベンジルオキシメチル基、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

## 【0014】

保護基の除去（脱離）方法としては、たとえば、Pd黒またはPd炭素などの触媒の存在下、水素気流中での接触還元；無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸またはこれら二種以上の混合液などによる酸処理；ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理；液体アンモニア中ナトリウムによる還元などが挙げられる。上記酸処理による脱離反応は、通常-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのカチオン捕捉剤を添加してもよい。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基は、チオフェノール処理により除去される。トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は、上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

反応に関与すべきでない官能基への保護基の導入法およびその保護基の脱離法、反応に関与する官能基の活性化法などは、自体公知の方法またはそれに準じた方法に従って行えばよい。

## 【0015】

また、ペータセルリン改変分子のアミド体は、以下の方法でも得ることができる。まず、カルボキシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化し、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -



アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の条件は上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のアミド体を得ることができる。

ベータセルリン改変分子のエステル体は、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして得られる。

#### 【0016】

本発明のベータセルリン改変分子をコードするDNAとしては、(1) ベータセルリンのN末端の1ないし30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から第22番目のアミノ酸残基と第23番目のアミノ酸残基との間に1ないし5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子、(2) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するベータセルリン改変分子をコードするDNAを含有するDNAであればいかなるものであってもよい。

具体的には、本発明の配列番号：1、配列番号：2、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有するベータセルリン改変分子をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。

より具体的には、(1) 配列番号：5ないし配列番号：7で表される塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(2) ストリンジェントな条件下で上記(1)で規定された配列とハイブリダイズするDNA、(3) 遺伝コードの縮重のため上記(1)および(2)に定められている配列とハイブリッド形成しないが、同一アミノ酸配列をもつポリペプチドをコードするDNAなどが挙げられる。ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法またはそれに準じた方法に従って行う。上記ストリンジェントな条件としては、例えば、42℃、50%ホルムアミド、4×SSPE (1×SSPE=150mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1mM EDTA pH7.4)、5×デンハート溶液、0.1%SDSが

挙げられる。

【0017】

本発明のベータセルリン改変分子を、ベータセルリン改変分子をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することにより製造する場合に用いられる発現ベクターとしては、例えば、(イ) 本発明のベータセルリン改変分子をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0018】

形質転換する際の宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどが利用できる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、T7プロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADH1プロモーター、GALプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、さらに所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40

ori と略称する場合がある) などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、dhfr と略称する場合がある) 遺伝子 [メソトレキセート (MTX) 耐性]、アンピシリン耐性遺伝子 (以下、Amp<sup>r</sup> と略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子 (以下、Neo と略称する場合がある、G418 耐性) 等が挙げられる。特に、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞を用いて DHFR 遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、チミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をベータセルリン改変分子の N 末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合、phoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合、メイテイングファクター  $\alpha$  (MF $\alpha$ )・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列などが、宿主が動物細胞である場合、例えばインシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築されたベータセルリン改変分子をコードする DNA を含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

#### 【0019】

宿主としては、例えばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60 巻, 160 (1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9 巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120 巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39 巻, 440 (1954)], MM294 [プロシージン

グズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 73巻, 4174(1976)) などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) M I 114 [ジーン, 24巻, 255(1983)] , 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry) , 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えばサッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) A H 2 2, A H 2 2 R<sup>-</sup>, N A 8 7-11 A, D K D-5 D, 20 B-12 などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature) , 315巻, 592(1985)] 。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが A c N P V の場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; S f 細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来の M G 1 細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 21 細胞 [以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro) , 13巻, 213-217頁 (1977年)] などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサル C O S-7 細胞、Vero 細胞、チャイニーズハムスター細胞 CHO、D H F R 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (d h f r<sup>-</sup> CHO 細胞)、マウス L 細胞、マウス 3 T 3 細胞、マウスミエローマ細胞、ヒト H E K 2 9 3 細胞、ヒト F L 細胞、293 細胞、C 1 2 7 細胞、B A L B 3 T 3 細胞、S p-2/O 細胞などが用いられる。

【0020】

エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A) , 69巻, 2110頁, 1972年、ジーン (Gene) , 1

7巻, 107頁, 1982年などに記載の方法に従って行えばよい。

バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行えばよい。

酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A), 75巻, 1929頁, 1978年に記載の方法に従って行えばよい。

昆虫または昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6巻, 47-55頁, 1988年などに記載の方法に従って行えばよい。

動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456頁, 1973年に記載の方法に従って行えばよい。

発現ベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リポフェクション法 [Folger, P.L. et al. プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 84巻, 7413頁, 1987年]、リン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456-467頁, 1973年]、電気穿孔法 [Neumann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.), 1巻, 841-845頁, 1982年] 等が挙げられる。

上述のごとく、本発明のベータセルリン改変分子をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

#### 【0021】

動物細胞を用いて、本発明のベータセルリン改変分子を安定に発現させる方法としては、上記の動物細胞に導入された発現ベクターが染色体に組み込まれた細胞をクローン選択によって選択する方法がある。具体的には、上記の選択マーカーを指標にして形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた動物細胞に対して、繰り返しクローン選択を行なうことにより本発明のベータセルリン改変分子等の高発現能を有する安定な動物細胞株を得ることが

できる。また、d h f r 遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、MTX濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、d h f r 遺伝子とともに、本発明のベータセルリン改変分子をコードするDNAを細胞内で増幅させて、さらに高発現の動物細胞株を得ることもできる。

【0022】

上記の形質転換体を本発明のベータセルリン改変分子をコードするDNAが発現可能な条件下で培養し、本発明のベータセルリン改変分子を生成、蓄積せしめることによって、本発明のベータセルリン改変分子を製造することができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有せしめる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えてもよい。該培養は通常約15〜43℃、約3〜24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングス・

オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505頁, 1980年]、0.5% カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー」 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330頁, 1984年] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気、攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195巻, 788頁, 1962年) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

#### 【0023】

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501頁, 1952年], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396頁, 1959年], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519頁, 1967年]、199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1頁, 1950年] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

特にCHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞およびdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いる場合には、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。

#### 【0024】

上記培養物から本発明のベータセルリン改変分子を分離精製する方法としては、例えば下記の方法が挙げられる。

本発明のベータセルリン改変分子を培養菌体または細胞から抽出するに際し、培養後、自体公知の方法で菌体または細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体または細胞を破壊した後、遠心分離、ろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液中、尿素、塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤、トリトンX-100（登録商標。以下、TMと省略することがある。）などの界面活性剤が含まれていてもよい。

培養液中にベータセルリン改変分子が分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法により菌体または細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のベータセルリン改変分子の精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なえばよい。該公知の分離・精製法としては、例えば、塩析、溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法、クロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のベータセルリン改変分子が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法またはそれに準じる方法により塩に変換することができ、また、本発明のベータセルリン改変分子が塩で得られた場合には自体公知の方法またはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

組換え体が産生する本発明のベータセルリン改変分子を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ベータセルリン改変分子を部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

得られるベータセルリン改変分子は、例えば、特開平10-191989号公報等に記載のリフォールディング工程に付してもよい。また、N末端のMetが



付加したベータセルリンムテインを特開平 10-191989 号公報等に記載の N 末端の Met の除去反応に付すことにより、N 末端の Met を除去することもできる。

かくして生成する本発明のベータセルリン改変分子の存在は、例えば特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

#### 【0025】

本発明のベータセルリン改変分子またはその塩、および本発明のベータセルリン改変分子をコードする DNA は、EGF 活性が減弱されていることおよび抗原性の問題がないことより、安全で低毒性な医薬として有用であり、例えば、糖尿病（例えば、I 型糖尿病（インシュリン依存性糖尿病）など）、糖尿病における膵臓機能障害、老人性のインシュリン分泌低下に伴う膵臓機能低下症、未分化型膵臓ガンなどの予防・治療剤として用いられる。好ましくは糖尿病予防・治療剤として用いられる。

本発明のベータセルリン改変分子またはその塩、および本発明のベータセルリン改変分子をコードする DNA を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

#### 【0026】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤

などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる本発明の医薬組成物は安全で低毒性であるので、例えば哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して安全に投与することができる。

本発明の医薬組成物の投与量は、症状などにより差異はあるが、例えば、経口投与の場合、一般的に成人の糖尿病患者（体重 60 kg として）に対し、一日当たりの活性成分（例、BTC 改変分子）を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、1 回当たりの投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによって異なるが、例えば注射剤として、成人の糖尿病患者（体重 60 kg として）に対し、一日につき約 0.01 ~ 30 mg、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg、

より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射により投与するのが好ましい。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

## 【0027】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号または当該分野における慣用略号に基づいて行い、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
APMSF	: (p-アミジノフェニル) メタンスルホニルフルオリド

## 塩酸塩

SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
TFA	: トリフルオロ酢酸
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸

A s p	: アスパラギン酸
L y s	: リジン
A r g	: アルギニン
H i s	: ヒスチジン
P h e	: フェニルアラニン
T y r	: チロシン
T r p	: トリプトファン
P r o	: プロリン
A s n	: アスパラギン
G l n	: グルタミン
N M P	: N-メチルピロリドン

【0028】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

M e	: メチル基
E t	: エチル基
B u	: ブチル基
P h	: フェニル基
T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
B o m	: ベンジルオキシメチル
P A M	: フェニルアセトアミドメチル
T o s	: p-トルエンスルフォニル
H O N B	: N-ヒドロキシー-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキ シイミド
B z l	: ベンジル基
Z	: ベンジルオキシカルボニル基
B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル基
C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル基
B o c	: t-ブチルオキシカルボニル基

H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
D C C	: N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド
T F A	: トリフルオロ酢酸
F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル基
D N P	: ジニトロフェニル基
B u m	: t-ブトキシメチル基
T r t	: トリチル基

【0029】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のベータセルリン改変分子（B T C31 - 58, Asn, Pro, Ser, 59 - 80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

本発明のベータセルリン改変分子（Asn, Ser, Asp, Ser, Glu, B T C38 - 80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：3〕

ベータセルリンのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕

本発明のベータセルリン改変分子（B T C1 - 58, Asn, Pro, Ser, 59 - 80）のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：5〕

配列番号：4 に示されるアミノ酸配列で表されるベータセルリン改変分子をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

配列番号：1 に示されるアミノ酸配列で表されるベータセルリン改変分子をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

配列番号：2 に示されるアミノ酸配列で表されるベータセルリン改変分子をコードする c D N A の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕

後述の参考例 1 および実施例 1 で用いられたプライマー B T-95 h の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕

後述の参考例 1 および実施例 2 で用いられたプライマー B T-94 h の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕

後述の実施例 1 で用いられたプライマー P E T-1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕

後述の実施例 1 で用いられたプライマー B T C-1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕

後述の実施例 1 で用いられたプライマー B T C-2 の塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕

後述の実施例 1 で用いられたプライマー B T C-3 の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕

後述の実施例 2 で用いられたプライマー B T C-7 の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕

後述の試験例 3 で用いられたプライマー R I-1 の塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕

後述の試験例 3 で用いられたプライマー R I-3 の塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕

後述の試験例 3 で用いられたプライマー R I-1 C l a の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕

後述の試験例 3 で用いられたプライマー R I-3 X h o の塩基配列を示す。

【0030】

後述の参考例 1 で用いられたプラスミド p T B 1 5 1 6 を保持する *E s c h e r i c h i a c o l i* M M 2 9 4 (D E 3) / p L y s S, p T B 1 5 1 6 は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (N I B H) に平成 4 年 4 月 21 日から受託番号 F E R M B P-3 8 3 6 として寄託され、また財団法人発酵

研究所に平成4年4月16日から受託番号IFO 15282として寄託されている。

【0031】

【実施例】

参考例1

50残基型ヒトベータセルリン(hBTC50)発現プラスミドpTB1976の構築

80残基型hBTC cDNAを組み込んだプラスミドpTB1516(特開平6-87894号公報記載;受託番号FERMBP-3836,受託番号IFO 15282)をテンプレートとして、プライマーBT-95h:5'-AGCATATGCGGAAAGGCCACTTCTCTAGGT-3'およびBT-94h:5'-CTGGATCCTAGTAAAACAAGTCAACTCTCT-3'を用いてPCRを行った。hBTCのC末50残基型の5'末端に翻訳開始コドンおよびNdeIサイトを、3'末端に終止コドンおよびBamHIサイトをそれぞれ挿入したPCR産物をNdeIおよびBamHIで消化し、T7ファージのΦ10プロモーターを保持する発現用プラスミドpET-3c(Novagen)のNdeI-BamHI部位にDNA Ligation Kit Ver. 2(Takara)を用いて組み込み、hBTC50の発現プラスミドpTB1976を作製した。組み込んだcDNAの塩基配列はABI社のDNAシーケンサー(ABI377 DNA Sequencer)により確認した。

プラスミドpTB1976の構築の概略を[図1]に示す。

【0032】

実施例1

Cys3-Cys4間にヘレギュリン(Her)に由来する3残基が挿入されたhBTC50改変分子A発現プラスミドpTB1985の構築

pTB1976をテンプレートとして、(1)5'側プライマーPET-1:5'-GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG-3'および3'側プライマーBTC-1:5'-AGGAGGGCGTCGAGGGGTCTGCTCGGCCA-3'、(2)5'側プライマーBTC-2:5'-T

GGCCGAGCAGAACCCCTCGACGCCCTCCT-3'および3'側プライマーBTC-3:5'-TCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTC-3'を用いて、それぞれPCRを行った。

次に(1)と(2)のPCR産物の混合物をテンプレートとして、5'側プライマーBT-95h、3'側プライマーBT-94hを用いてPCRを行い、hBTC50のCys3-Cys4間にHerの配列中の3アミノ酸(Asn, Pro, Ser)を挿入した改変分子AをコードするDNA断片を得た。このDNA断片をNdeIおよびBamHIで消化後、pET-3cのNdeI-BamHI部位に組み込み、pTB1985を作製した。

【0033】

## 実施例2

N末7残基をその部位に相当する上皮成長因子(EGF)の5残基で置換されたhBTC50改変分子B発現プラスミドpTB1987の構築

pTB1976をテンプレートとして、5'側プライマーBTC-7:5'-TATACATATGAACAGCGACTCTGAGTGCCCCCAAGC-3'および3'側プライマーBT-94hを用いてPCRを行い、hBTC50のN末7残基を相当するEGFの5残基に置換した改変分子BをコードするDNA断片を得た。このDNA断片をNdeIおよびBamHIで消化後、pET3cのNdeI-BamHI部位に組み込み、pTB1987を作製した。

【0034】

## 実施例3

### 大腸菌での発現

T7ファージのΦ10プロモーターの支配下に、上記参考例および実施例で得られたプラスミドpTB1976、プラスミドpTB1985およびプラスミドpTB1987を、発現用大腸菌BL21(DE3)/pLysS(Novagen)に導入した。それぞれの大腸菌組換え体を100μg/mlアンピシリンおよび10μg/mlクロラムフェニコールを含むLB培地を用いて37℃で培養した。クレットユニット160の時点でイソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシドを最終濃度0.4mMになるように添加し、さらに37℃で4時間培



養を継続した。培養後遠心により集菌し、抽出操作まで-80℃で保存した。

【0035】

#### 実施例 4

hBTC50、改変分子Aおよび改変分子Bの精製

##### 4-1) 大腸菌封入体の調製

400mlの培養液から集めた菌体を20mlの10mM Tris-HCl (pH8.0)、10% sucrose、10mM EDTAに懸濁して、凍結・融解した後、氷中に30分間静置して完全に細胞を溶かした。氷冷下で超音波破碎(10sec, 3回)後、遠心(9000rpm, 15min, 4℃: Beckman)して再度沈殿を集めた。この洗浄操作を3回繰り返して封入体を調製した。

##### 4-2) タンパクの抽出およびリフォールディング

4-1) で得られた封入体を8mlの7M guanidine-HCl、0.1M Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH8.0)、1mM EDTAに懸濁して4℃、1時間スターラーで穏やかに攪拌し、組換えタンパクを抽出した。次に還元型グルタチオンを0.1Mになるように添加して、NaOH溶液でpHを8.4に合わせた後、抽出液中に窒素ガスを吹き込み空気と置換した。室温で2時間静置した後、20倍容量の10mM Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH8.0)、0.5mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、1mM ベンズアミジンで希釈した。遠心(9000rpm, 15min, 25℃)して不溶物を除いた上清に、酸化型グルタチオンを0.5mMになるように添加し、室温で16時間静置した。次いで、遠心(9000rpm, 15min, 25℃)上清を凍結乾燥して濃縮後、4℃で50mM Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH5.5)、1mM EDTAに透析(Spectra por: MWCO 1,000)した。透析後、遠心(9000rpm, 15min, 4℃)上清を酢酸セルロース膜(Millex GV, 0.22 μm: Millipore)で濾過して、不溶物を除いた。

##### 4-3) タンパクの精製

リフォールディングしたタンパクを含む溶液を50mM 酢酸ナトリウム(pH

H5. 5) で平衡化した陽イオン交換HPLCカラム (250×4.1mm I. d., Synchron CM300, Synchropak) にかけて、0-1MのNaCl濃度勾配でタンパクを溶出、分画した。OD<sub>280</sub>でモニターした溶出画分を、0.1% HCl、1% CH<sub>3</sub>CNで平衡化したC<sub>4</sub>逆相HPLCカラム (150×4.6mm I. d., Ultron 300 C<sub>4</sub>: Chromatopacking Center) にかけて、1-40%のCH<sub>3</sub>CN濃度勾配で溶出した。次にカラムクロマトグラフィーで得たピーク画分を凍結乾燥した。改変分子AおよびBの収量は、各々78.7μgおよび103.1μgであった。

#### 4-4) タンパクの純度検定

精製標品の純度検定の目的で、C<sub>18</sub>逆相HPLCカラム (150×4.6mm i. d., ODS120T, Tosoh) にかけて、15~30%のCH<sub>3</sub>CN濃度勾配で溶出し、改変分子AおよびBのピークパターンの単一性を確認した。両タンパクの純度は94%以上であることが分かった。

【0036】

#### 試験例 1

##### 3T3細胞を用いた細胞増殖促進活性の測定

モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、8巻、588頁、1988年に記載の方法に準じ、静止状態の3T3 A31-714クローン4 (インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー、12巻、463頁、1973年) 中への<sup>3</sup>H-チミジンの取り込みによって細胞増殖促進活性を測定した。

5% ウシ血清を含むダルベッコ改変イーグルMEM培地を用いて、1000細胞/mLになるように懸濁した3T3 A31-714クローン4を96ウェルプレートに100μLずつ播き、炭酸ガスインキュベーター内 (5%炭酸ガス、95%空気) において37℃で1日培養した。上清75μLを抜き取り、血清を含まないダルベッコ改変イーグルMEM培地を100μL加えることにより血清濃度を1%にした。さらに2日間培養した後、種々の濃度の上記の実施例で調製したhBTC50、改変分子Aまたは改変分子Bを添加した。添加16時間後に<sup>3</sup>H-チミジン [アマーシャム・ファルマシア・バイオテク] を0.25μC

i/well 加え、その4時間後に細胞をPBSで3回洗浄した後、5% SDSを100  $\mu$ L加え細胞を溶解した。細胞溶解液をシンチレーションバイアルに移し、シンチレーターA（和光純薬社）を1mL加え、シンチレーションカウンターで<sup>3</sup>H-チミジンの細胞への取り込みを測定した。

この測定結果より、80残基型ベータセルリン（標準品）の最大取り込み値を100%として、50%の活性を示した時のhBTC50および改変分子の濃度（ED<sub>50</sub>）を求めた結果を、表1に示す。

表1 細胞増殖促進活性

サンプル	ED <sub>50</sub> (nM)
hBTC50	0.01
改変分子A	0.6
改変分子B	>10.0

【0037】

## 試験例2

### AR42J細胞を用いた $\beta$ 細胞分化誘導活性の測定

上記で調製したhBTC50、改変分子A、改変分子Bおよび特開平10-191989号に記載の方法により調製した80残基型ベータセルリン（hBTC80）から選ばれる1種と、10% ウシ胎児血清とを含むダルベッコ改変イーグルMEM培地に、化学発癌剤で誘発された脾臓癌由来細胞株AR42J [Chiristophe; アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロギー (Am. J. Physiol.) , 266巻、G963頁、1994年] を10<sup>5</sup>細胞/mLになるように懸濁し、500  $\mu$ Lをチャンバースライドに播き、炭酸ガスインキュベーター内（5% 炭酸ガス、95%空気）において37℃で5日間培養した。5日後に細胞をPBSで1回洗浄した後に、10%ホルムアルデヒドで固定し、0.1%トリトンX-100で5分間処理した後に、ブロックエース（雪印、日本）を添加し、室温で40分間ブロッキングを行った。10%ブロックエースで希釈した抗インスリン抗体（アドバンスド・イムノ・ケミカル社）を添加し室温、40分間反応した。0.1%トリトンX-100を添加し室温5分間放置した後、PBSで3回洗浄した。

10%ブロッケーヌで希釈したFITC (Fluorescein Isothiocyanate) 標識抗マウスIgG抗体(カッセル社)を添加し、室温で40分間反応した。0.1%トリトンX-100を添加し室温5分間放置した後、PBSで3回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、hBTC80を添加した場合と同様に、hBTC50、改変分子Aおよび改変分子Bを添加した場合においても、蛍光染色された細胞、すなわちインスリンを産生するβ細胞に分化した細胞が観察された。

また、インスリン産生細胞の出現頻度は、hBTC80、hBTC50、改変分子Aおよび改変分子B間で差が見られなかった。

【0038】

### 試験例3

PLAP発現AR42J細胞を用いたβ細胞分化誘導活性の測定

#### 3-1) ヒト胎盤アルカリフォスファターゼ遺伝子発現ベクターの構築

β細胞への分化促進活性はインスリンプロモーターの下流にレポーターとしてアルカリフォスファターゼ遺伝子を連結したものにより形質転換されたAR42J細胞を用いても実施した。すなわちベクターセルリンによりβ細胞へと分化した細胞はアルカリフォスファターゼを産生し、このアルカリフォスファターゼの活性を測定することによりβ細胞への分化促進活性を定量的に測定することが可能である。

ラット尾から常法に従ってゲノムDNAを調製した。このDNAをテンプレートとして、既報のラットインスリンII遺伝子プロモーターの塩基配列 (GenBank: Accession No. J00748) をもとに合成したプライマーRI-1: 5'-AGAGTCAAGGATCCCCCAACCACT-3'およびプライマーRI-3: 5'-AGCTGGTCACTTAGGGCTGGGG-3'を用いてPCR法によりインスリンプロモーター領域0.75 Kbを増幅した。さらに、このPCR産物をテンプレートとしてプライマーRI-1C1a: 5'-GAATCGATAGAGTCAAGGATCCCCCA-3'およびプライマーRI-3Xho: 5'-GACTCGAGCTGGTCACTTAGGG-3'を用いてPCRを行った。増幅された0.75 Kb DNA断片を単離し、pT7Blueベ

クター (Novagen 69820-1) に組み込んで得られたプラスミド pTB1881 を用いてクローニングされた断片の塩基配列を決定し、ラットインスリン II プロモーターであることを確認した。プラスミド pTB1881 を Xho I - Cla I で切断してラットインスリンプロモーターである 0.73 kb DNA 断片を得た。次にヒト胎盤アルカリフォスファターゼ (PLAP) をコードする 2.0 kb cDNA (J. Berger ら、Gene 66, 1(1988)) の発現プラスミド pTB1330 を Xho I - Hind III で切断して得られた 2.7 kb DNA 断片 (PLAP cDNA、SV40 由来スプライシング部位およびポリ A 付加部位、pBR322 由来 ori およびアンピシリン耐性遺伝子を含む) を単離し、前述のラットインシュリンプロモーター領域 0.73 kb Xho I - Cla I 断片を T4 DNA リガーゼ反応によって連結してプラスミド pTB1898 を得た。

#### 【0039】

#### 3-2) PLAP 発現 AR42J 細胞の構築

AR42J 細胞に PLAP 発現プラスミド pTB1898 と Tn5 の neo<sup>r</sup> 遺伝子を含むプラスミド pMCneo poly A (STRATAGENE) をトランスフェクション試薬 TransIT<sup>TM</sup>-LT1 (Mirus, PenVera Corporation) を用いて同時に導入した。導入後の細胞は 10% 牛胎児血清を加えた DMEM で 2 日間培養した後、G418 (ゲネチシン、GIBCO BRL) 800  $\mu$ g/mL を添加した選択培地にかえて培養を続けた。G418 耐性となって生育した細胞を限界希釈法によりクローンを単離した。

各クローンの細胞を 24 穴プレートに播き、80 残基型 BTC を 20 ng/mL 添加および無添加で 4 日間培養し、培養上清を集めて 65℃、30 分間熱処理を行った後、培地中のアルカリフォスファターゼ活性を測定した。80 残基型ベータセルリン添加時にアルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められるクローンを選択し、その中の 1 クローン AR71-104 を以下の検討に用いた。

#### 3-3) PLAP 発現 AR42J 細胞を用いた $\beta$ 細胞分化誘導活性の測定

各種濃度の上記で調製した hBTC50、改変型分子 A および改変型分子 B から選ばれる 1 種と、10% ウシ胎児血清とを含むダルベッコ改変イーグル MEM 培地に、上記 3-2) で構築した PLAP 発現 AR42J 細胞を  $3 \times 10^4$  細胞

／mLになるように懸濁し、100  $\mu$ Lを96ウェルプレートに播き、炭酸ガスインキュベーター内（5% 炭酸ガス、95%空気）において37℃で5日間培養した。5日後に培養上清をサンプリングし、65℃で30分間処理した後、50  $\mu$ Lをあらかじめ50  $\mu$ Lの2XSEAP（2Mジエタノールアミン、1mM  $MgCl_2$ 、20mMホモアルギニン）を添加した96ウェルマイクロプレートに加えた。37℃で10分間保った後、20mg/mLのp-ニトロフェニリン酸（シグマ社）を10  $\mu$ L添加し37℃で16時間反応を行い、405nmの吸光度 $A_{405}$ を測定した。

hBTC50添加時の最大吸光度を100%とした際の50%の活性を示すに必要なタンパク濃度（ED<sub>50</sub>）を表2に示す。

表 2  $\beta$ 細胞への分化誘導活性

サンプル	ED <sub>50</sub> (nM)
hBTC50	0.15
改変分子A	0.5
改変分子B	0.7

【0040】

#### 【発明の効果】

本発明のベータセルリン改変分子またはその塩は、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱されており、抗原性の問題もないことから、優れた糖尿病予防・治療薬として有用である。

【0041】

#### 【配列表】

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Betacellulin Mutein

<130> A99028

<160> 18

<210> 1

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 1

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

5

10

15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr

20

25

30

Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg

35

40

45

Val Asp Leu Phe Tyr

50

<210> 2

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 2

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

5

10

15

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

20

25

30

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

35

40

45

<210> 3

<211> 80

<212> PRT

<213> Human

<400> 3

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
		20						25					30		
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35						40					45			
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Thr	Pro	Ser	Cys	Val	Cys
	50					55				60					
Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp	Leu	Phe	Tyr
65				70					75				80		

<210> 4

<211> 83

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 4

Asp	Gly	Asn	Ser	Thr	Arg	Ser	Pro	Glu	Thr	Asn	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly
1				5					10					15	
Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	Cys	Ala	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	Ser	Lys	Arg	Lys
		20						25					30		
Gly	His	Phe	Ser	Arg	Cys	Pro	Lys	Gln	Tyr	Lys	His	Tyr	Cys	Ile	Lys
	35						40					45			
Gly	Arg	Cys	Arg	Phe	Val	Val	Ala	Glu	Gln	Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser
	50					55				60					
Cys	Val	Cys	Asp	Glu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Arg	Val	Asp
65				70					75				80		



Leu Phe Tyr

<210> 5

<211> 249

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 5

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60  
 AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120  
 CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGAACCCC 180  
 TCGACGCCCT CCTGTGTCTG TGATGAAGGC TACATTGGAG CAAGGTGTGA GAGAGTTGAC 240  
 TTGTTTTAC 249

<210> 6

<211> 159

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60  
 TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGAACCCC TCGACGCCCT CCTGTGTCTG TGATGAAGGC 120  
 TACATTGGAG CAAGGTGTGA GAGAGTTGAC TTGTTTTAC 159

<210> 7

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

AACAGCGACT CTGAGTGCCC CAAGCAATAC AAGCATTACT GCATCAAAGG GAGATGCCGC 60  
TTCGTGGTGG CCGAGCAGAC GCCCTCCTGT GTCTGTGATG AAGGCTACAT TGGAGCAAGG 120  
TGTGAGAGAG TTGACTTGTT TTAC 144

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 8

AGCATATGCG GAAAGGCCAC TTCTCTAGGT 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 9

CTGGATCCTA GTAAAACAAG TCAACTCTCT 30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG 30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

AGGAGGGCGT CGAGGGGTTT TGCTCGGCCA

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

TGGCCGAGCA GAACCCCTCG ACGCCCTCCT

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

TCTATGCGCA CCGTTCTCG GAGCACTGTC

30

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 14

TATACATATG AACAGCGACT CTGAGTGCCC CAAGC

35

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 15

AGAGTCAAGG ATCCCCAAC CACT

24

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 16

AGCTGGTCAC TTAGGGCTGG GG

22

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 17

GAATCGATAG AGTCAAGGAT CCCCCA

26

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 18

GACTCGAGCT GGTCACCTTAG GG

22

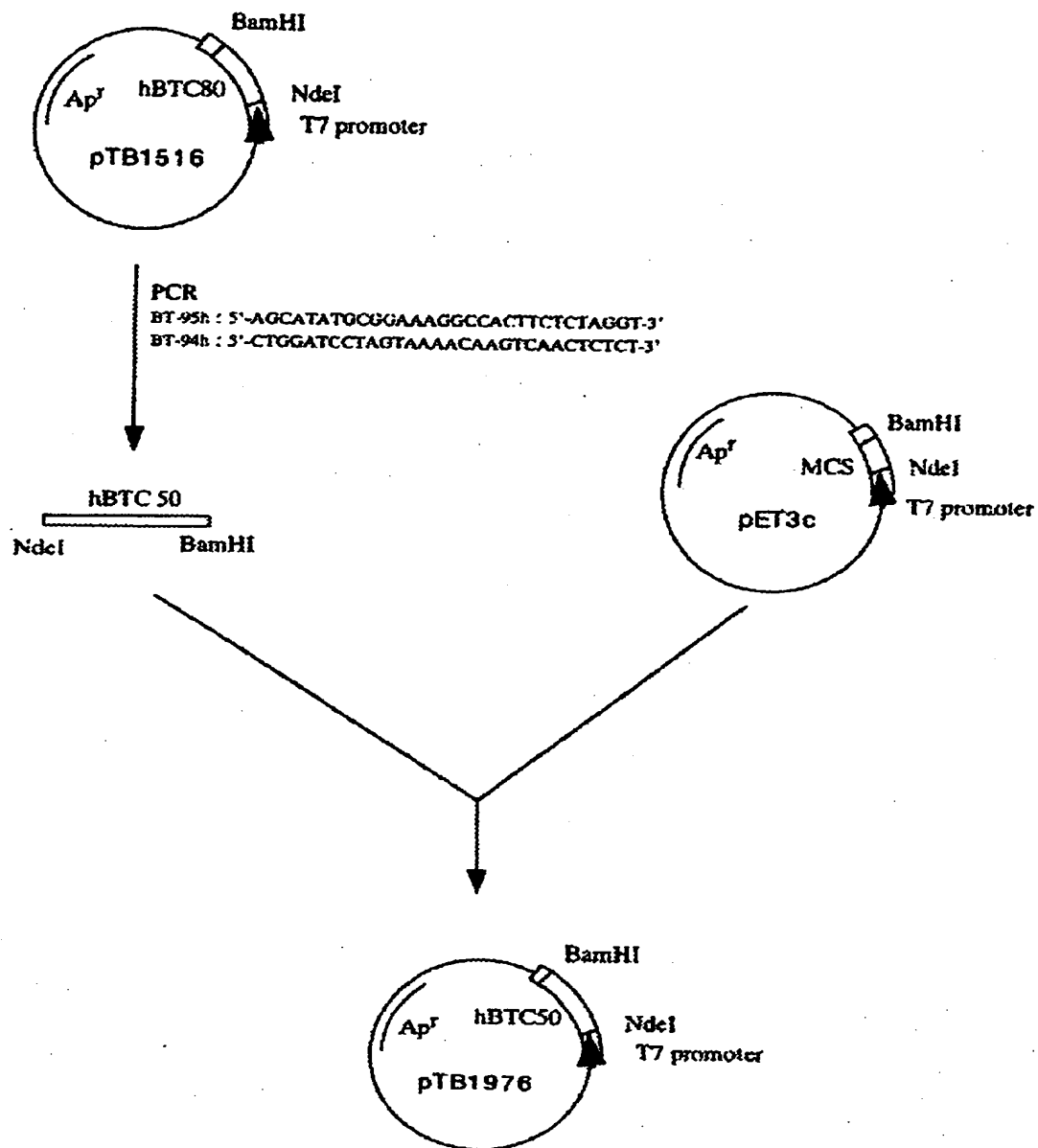
【 0 0 4 2 】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 参考例 1 記載のプラスミド p T B 1 9 7 6 の構築の概略を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



hBTC50 発現プラスミド pTB1976 の構築

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた糖尿病治療薬の提供。

【解決手段】 本発明のベータセルリンのN末端の1～30個のアミノ酸残基が欠失していてもよく、C末端から22番目のアミノ酸残基と23番目のアミノ酸残基との間に1～5個のアミノ酸残基が挿入されたベータセルリン改変分子、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するベータセルリン改変分子またはそれらの塩は、BTC活性を保持したまま、EGF活性が減弱されており、優れた糖尿病治療薬として有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日

[変更理由] 住所変更

住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

氏 名 武田薬品工業株式会社





H11-55326

[Designation of Document] Patent Application

[Reference Number] A99028

[Filing Date] March 3, 1999

[Address] Commissioner of the Patent Office

[International Classification] C12N 15/12

C07K 13/00

[Title of the Invention] BETACELLULIN MUTEIN

[Number of Claim(s)] 7

[Inventor]

[Address] 66-3, Shimogamo-miyazakicho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, KYOTO

[Name] IGARASHI Koichi

[Inventor]

[Address] 6-8, Tenjin 4-chome, Nagaokakyo-shi, KYOTO

[Name] Reiko SASADA

[Applicant for patent]

[Identification Number] 000002934

[Name Person or Legal Person] TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

[Representative] TAKEDA Kunio

[Attorney]

[Identification Number] 100073955

[Patent Attorney]

[Name Person or Legal Person] ASAHINA Tadao

[Appointed Attorney]

[Identification Number] 100110456

[Patent Attorney]

[Name Person or Legal Person] UCHIYAMA Tsutomu

[Details of Commission]

[Prepayment Register Number] 005142

[Amount of Payment] 21000

[List of What It Submitted]

[Name of What Is Submitted] Specification 1

[Name of What Is Submitted] Drawings 1

[Name of What Is Submitted] Abstract 1

[General Power of Attorney] 9000053

[General Power of Attorney] 9721047

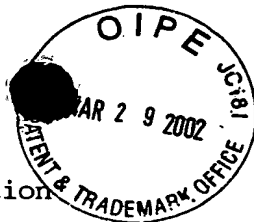


[Request of poof]

Yes

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



[Document] Specification

[Title of the Invention] Betacellulin Mutated Molecule

[Claims]

[Claim 1] A betacellulin mutated molecule or salt thereof according to Claim 1, wherein 1 to 30 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted, and 1 to 5 amino acid residues may be inserted between the 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> amino acid residues from the C terminal.

[Claim 2] A betacellulin mutated molecule or salt thereof according to Claim 1, wherein 1 to 30 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin have been deleted.

[Claim 3] A betacellulin mutated molecule or salt thereof according to Claim 1, comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1.

[Claim 4] A betacellulin mutated molecule or salt thereof comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2.

[Claim 5] A method for manufacturing a betacellulin mutated molecule or salt thereof according to Claims 1 or 4, characterized by culturing the transformants which have been transformed with recombinant vectors containing DNA encoding the betacellulin mutated molecule according to Claims 1 or 4 to produce said betacellulin mutated molecule.

[Claims 6] A pharmaceutical composition comprising a betacellulin mutated molecule or salt thereof according to Claims 1 or 4.

[Claim 7] A pharmaceutical composition according to Claim 6, wherein the composition is a prophylactic or therapeutic drugs for diabetes.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

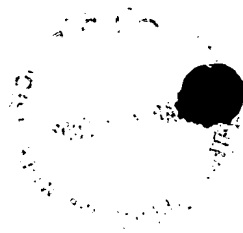
[Technical Field to which the Invention pertains]

The present invention relates to betacellulin (hereinafter, sometimes to be referred to as BTC) mutated molecule, DNA encoding it, manufacturing method of the mutated molecule and their uses.

[0002]

[Prior Art]

Betacellulin (BTC) is a cell growth factor that is isolated and purified from culture supernatant of mouse BTC-3 insulinoma cells (Science, 259, 1604 (1993)). Mouse BTC is synthesized as membrane-bound



THIS PAGE BLANK (USPTO)

prepromolecule (precursor) comprising 177 amino acid residues. Subsequently, it is secreted as a mature molecule having 80 amino acid residues after processing. Human BTC is synthesized as membrane-bound precursor and is secreted as a mature molecule having 80 amino acid residues after processing in a similar manner. A sequence comprising 30 amino acid residues from amino terminal (N terminal) has no homology to amino acid sequences of other proteins, while a sequence comprising 50 amino acid residues from carboxyl terminal (C terminal) is highly homologous to the sequence comprising 6 cysteine residues, which is conserved among the members of epidermal growth factor (EGF) family. Thus, BTC is considered as a member of the EGF family. Since an amount of betacellulin presented in vivo is extremely low, it is difficult to acquire the protein. However, a manufacturing method using gene technology is described in Patent Kokai Hei6-87894 Koho etc.

Betacellulin has growth promoting activity to fibroblast cells, vascular smooth muscle cells, pigment epithelial cells and others, in a similar manner as EGF (Science, 259, 1604 (1993)). It is also reported that <sup>125</sup>I-labeled betacellulin binds to EGF receptor (The Journal of Biological Chemistry, 269, 9966 (1994)) and that the cell growth promoting activity of betacellulin is inhibited by an antibody against EGF receptor (Biological and Biophysical Research Communication, 190, 1173 (1993)). It is suggested from these results that EGF receptor-mediated signal transduction is participated with expression of the cell growth promoting activity, that is, DNA synthesis inducing activity of BTC.

[0003]

On the other hand, it is reported that betacellulin has an activity other than the cell growth promoting activity, which differentiates exocrine pancreatic cells to endocrine  $\beta$  cells. A subclone of AR42J cell line derived from rat tumor cells of pancreatic duct, AR42J-B20 cell line is a cell exhibiting both characters of exocrine and neuroendocrine cells (American Journal of Physiology, 266, G963 (1994)). This cell differentiates to insulin-producing cell when it is cultivated with BTC at the presence of Activin A (Journal of Clinical Investigation, 97, 1647 (1996)). Since this differentiating

THIS PAGE BLANK (USPTO)



activity is not detected in the case where the same concentration of EGF or Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) is used, it is considered that betacellulin exhibits the differentiating activity to  $\beta$  cells through a receptor other than EGF receptor.

The differentiating activity to pancreatic  $\beta$  cells of betacellulin is effective for treatment of diabetes, particularly type I diabetes caused by destructive lesion of pancreatic  $\beta$  cells. It is experimentally known that by hypodermic administration of betacellulin to model mouse for partial reflux alloxan diabetes, neogenesis/regeneration of pancreatic  $\beta$  cells are observed and glucose tolerance is improved (Abstracts of the 1998 Japan Diabetes Association Conference, 125).

[0004]

[Problem to be solved by the Invention]

However, two problems below are present when betacellulin is actually administered to the living body. The first problem is a cell growth stimulating activity (EGF activity). There is a possibility that side effects occur by an affection of the EGF activity that betacellulin possesses to extensive cells of tissues or organs except for pancreas. The second problem is an affinity for EGF receptor. In the case where we consider an endogenous kinetics of betacellulin after in vivo administration, there is a possibility that dose of betacellulin relatively increases for medicinal effects against pancreas, since a majority of administered molecules bind to EGF receptors in the organs except for pancreas and is consumed.

In order to solve the problems described above and apply betacellulin as a novel therapeutic drug for diabetes, it is desired to prepare a mutated molecule of betacellulin that have intact differentiating activity to pancreatic  $\beta$  cells and no binding capability to EGF receptor.

[0005]

[Means for solving a Problem]

The inventors prepared a variety of betacellulin mutated molecules by adding or inserting amino acids to a part of amino acid sequence of the C-terminal 50 amino acid residues molecule (BTC50) that exhibits DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

synthesis promoting activity and differentiation promoting activity for 3T3 substantially identical to 80 amino acid residue type mature protein or substituting amino acids for other amino acids. The inventors further studied its biological activity and found the first case of betacellulin mutated molecules that have intact differentiation promoting activity to pancreatic  $\beta$  cells and no binding capability to EGF receptor. Finally, the inventors completed the present invention.

[0006]

That is, the present invention relates to:

1. A betacellulin or salt thereof, wherein 1 to 30 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted, and 1 to 5 amino acid residues may be inserted between the 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> amino acid residues from the C terminal;
2. A betacellulin or salt thereof according to 1 above, wherein 1 to 30 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin have been deleted;
3. A betacellulin or salt thereof according to 1 above, comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1;
4. A betacellulin or salt thereof, comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2;
5. A method for manufacturing a betacellulin or salt thereof according to 1 or 4 above, characterized by culturing the transformants which have been transformed with recombinant vectors containing DNA encoding the betacellulin according to 1 or 4 above to produce said betacellulin mutated molecule;
6. A pharmaceutical composition comprising a betacellulin or salt thereof according to 1 or 4 above;
7. A composition according to 6 above, wherein the pharmaceutical composition is a prophylactic or therapeutic drug for diabetes.

[0007]

[Mode for Carrying Out the Invention]

As described above, the betacellulin mutated molecule (betacellulin mutein) have intact differentiation promoting activity to pancreatic  $\beta$  cells (BTC activity) and reduced EGF activity.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

"Betacellulin mutated molecule" of the present invention may be a betacellulin mutated molecule that has an intact BTC activity and reduced EGF activity. For example, it includes (1) Betacellulin mutated molecules in which 1 to 30 amino acid residues of the N terminal may be deleted, and 1 to 5 amino acid residues have been inserted between the 22<sup>nd</sup> amino acid residue and the 23<sup>rd</sup> amino acid residue of the C terminal or salt thereof and (2) betacellulin mutated molecule comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2 or salt thereof.

"Betacellulin" in "betacellulin mutated molecules" of the present invention refers to as a polypeptide comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro  
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser  
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val  
Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg  
Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

described in Sasada et al.; Biochemical and Biophysical Research Communications (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 190, 1173 (1993).

"Insertion of amino acid residues" in "betacellulin mutated molecules in which such amino acid residues have been inserted" may be insertion that no antigenicity-related problem occurs when the betacellulin is administered into the living body. It does not care what is amino acid residue or peptide chain. Specific examples of "amino acids" above include nonpolar (hydrophobic) amino acids (such as alanine, leucine, isoleucine, valine, proline, phenylalanine, tryptophan, and methionine), polar (neutral) amino acids (such as glycine, serine, threonine, cysteine, tyrosine, asparagine, and glutamine), amino acids with a positive charge (basic) (such as arginine, lysine, and histidine), and amino acids with a negative charge (acidic) (such as aspartic acid and glutamic acid). Asparagine, proline, and serine are preferred. Specific examples of "peptide chains" above refer to peptide chains of two to five such "amino acids" bound together, and preferably includes peptide chains consisting of 2 to 4 amino acid residues.

[0008]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Examples of "betacellulin in which 1 to 30 amino acid residues of the N terminal may be deleted" include (1) polypeptides with an amino acid sequence represented by the aforementioned SEQ ID NO: 3, (2) betacellulin mutated molecules in which 1 to 30 amino acid residues of the N terminal have been deleted, and (3) betacellulin mutated molecules in which amino acid residues (e.g., 1 to 5 amino acid residues) have been inserted in the amino acid sequence of the 1<sup>st</sup> through 30<sup>th</sup> residues of the N terminal of betacellulin.

"Betacellulin mutated molecules in which 1 to 30 amino acid residues of the N terminal have been deleted" include 1) those in which 1 to 30 amino acid residues of the N terminal of betacellulin have been deleted, and 2) those in which 1 to 30 amino acid residues of the N terminal of betacellulin have been deleted, and other amino acid residues (e.g., 1 to 5 amino acid residues) have been added.

[0009]

"Betacellulin mutated molecules in which 1 to 30 amino acid residues of the N terminal may be deleted, and 1 to 5 amino acid residues have been inserted between the 22<sup>nd</sup> amino acid residue of the C terminal (i.e., Gln, the 58<sup>th</sup> amino acid residue from the N terminal in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3) and the 23<sup>rd</sup> amino acid residue (i.e., Thr, the 59<sup>th</sup> amino acid residue from the N terminal in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 3)" should be betacellulin mutated molecules in which some of 1 through 30 amino acid residues of the N terminal of betacellulin may be deleted, and 1 to 5 amino acid residues have been inserted between the 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> amino acid residues from the C terminal. Specific examples include:

((1)) betacellulin mutated molecules with an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 4

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro  
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys Gly His Phe Ser  
Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val  
Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile  
Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

((2)) betacellulin mutated molecules in which the 1<sup>st</sup> through 30<sup>th</sup> amino acid residues from the N terminal of betacellulin have been deleted

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly Asp Pro  
Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys

and 1 to 5 amino acid residues have been inserted between the 22<sup>nd</sup> and  
23<sup>rd</sup> amino acid residues from the C terminal, such as a betacellulin  
mutated molecule with an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:  
1:

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys  
Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser Cys Val  
Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

Preferred examples of "betacellulin mutated molecules" of the  
present invention include the betacellulin mutated molecules having an  
amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or 2.

[0010]

In accordance with the conventional manner for designating  
peptides, the left terminal of the betacellulin mutated molecules in the  
present Specification is referred to as the N terminal (amino terminal),  
and the right terminal is referred to as the C terminal (carboxyl  
terminal). The C terminal of these betacellulin mutated molecules is  
usually a carboxyl group (-COOH) or carboxylate (-COO<sup>-</sup>), but the C  
terminal may also be an amide (-CONH<sub>2</sub>) or ester (-COOR).

Examples of R in such esters include C<sub>1-6</sub> alkyl groups such as  
methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, or n-butyl, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl groups  
such as cyclopentyl and cyclohexyl, C<sub>6-12</sub> aryl groups such as phenyl and  
 $\alpha$ -naphthyl, phenyl-C<sub>1-2</sub> alkyls such as benzyl, phenethyl, and benzhydryl,  
or C<sub>7-14</sub> aralkyl groups such as  $\alpha$ -naphthyl-C<sub>1-2</sub> alkyls such as  $\alpha$ -  
naphthylmethyl, and pivaloyloxymethyl groups.

Examples of salts of the betacellulin mutated molecules of the  
present invention include salts with physiologically acceptable bases  
(e.g., alkali metals) or acids (organic and inorganic acids), in  
particular physiologically acceptable acid salts are preferred.  
Examples of such salts include salts with inorganic acids (e.g.,  
hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, and sulfuric acid),  
and acids with organic acids (e.g., acetic acid, formic acid, propionic  
acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric

THIS PAGE BLANK (USPTO)

acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, and benzenesulfonic acid).

[0011]

The betacellulin mutated molecules of the present invention can be prepared by genetic engineering as described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H6-87894, for example, or by a protease treatment that is publicly known, preferably a carboxypeptidase treatment, and even more preferably bovine pancreatic carboxypeptidase A treatment, of betacellulin obtained by the culture of beta tumor cells. They can also be prepared according to the peptide synthesis described below. They can furthermore be manufactured by the culture of transformants containing DNA encoding betacellulin mutated molecules, as described below.

Peptides may be synthesized by either solid phase synthesis or liquid phase synthesis, for example. That is, partial peptides or amino acids capable of composing the betacellulin mutated molecules of the present invention are condensed with the remainder, and protection groups are eliminated when the product has protection groups, whereby the target betacellulin mutated molecule can be manufactured. The publicly known methods for condensation and the removal of protection groups include the following methods in (1) through (5).

(1) M. Bodanszky and M.A. Ondetti, *Peptide Synthesis*, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder and Luebke, *The Peptide*, Academic Press, New York (1965)

(3) Nobuo Izumiya et al, *Peptide Synthesis Fundamentals and Experiments*, Maruzen (1975)

(4) Jimei Yashima and Toshihira Kashiwahara, *Basic Biochemical Experiments*, Vol. 1, Protein Chemistry IV, 205 (1977)

(5) *Sequel Development of Medical Drugs*, Vol. 14, *Peptide Synthesis*, Kadokawa Shoten, Ed. Jimei Yashima

After the reaction, the polypeptide of the present invention can be purified and isolated by a combination with, for example, solvent extraction, distillation, column chromatography, liquid chromatography, and recrystallization. When the resulting polypeptide is in free form,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

it can be converted to a suitable salt by a publicly known method. Alternatively, when a salt form is obtained, it can be converted to free form by a publicly known method.

[0012]

Commercially available peptide binding resins suitable for amide formation can be used for amide forms of betacellulin. Examples of such resins include chloromethyl resins, hydroxymethyl resins, benzhydrylamine resins, aminomethyl resins, 4-benzyloxybenzyl alcohol resins, 4-methylbenzhydrylamine resins, PAM resins, 4-hydroxymethyl methylphenyl acetamide methyl resins, polyacrylamide resins, 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-hydroxymethyl)phenoxy resins, and 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc aminoethyl)phenoxy resins. Such resins can be used for the condensation of amino acids with suitably protected side chain functional groups and  $\alpha$ -amino groups on resin in accordance with various publicly known methods of condensation as befits the sequence of the intended peptide. After the reaction, the peptide is excised from the resin, the various protection groups are simultaneously removed, and a reaction for forming intramolecular disulfide bonds is brought about in a highly diluted solution as needed to obtain the target amide forms.

Although various activating reagents that can be used for peptide synthesis may be used for the condensation of such protected amino acids, carbodiimides are particularly preferred. Examples of carbodiimides include DCC, N,N'-diisopropylcarbodiimide, and N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. For activation with the above, racemization inhibitors (e.g., HOBt and HOObt) and protected amino acids can be added directly to the resin, or they can be added in the form of corresponding acid anhydrides or HOBt esters or HOObt esters to the resin after the activation of the protected amino acids. Solvents which are used for the condensation with resins or the activation of protected amino acids can be suitably selected from solvents which are known to be capable of being used for peptide condensation. Examples include acid amides such as N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide, and N-methylpyrrolidone, halogenated hydrocarbons such as methylene chloride and chloroform, alcohols such as trifluoroethanol, sulfoxides such as dimethylsulfoxide, tertiary amines such as pyridine, ethers such as

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dioxane and tetrahydrofuran, nitriles such as acetonitrile and propionitrile, esters such as methyl acetate and ethyl acetate, and suitable mixtures of the above. The reaction temperature can be suitably selected from within the known usable range in the formation of peptide bonds, which is usually about -20 to 50°C. Activated amino acid derivatives are usually used in an excess amount of 1.5 to 4 folds. When ninhydrin reaction tests reveal insufficient condensation, the condensation is repeated without removing the protection groups until sufficient condensation has been achieved. When repeated reaction fails to provide sufficient condensation, acetic acid anhydride or acetyl imidazole may be used for the acetylation of the unreacted amino acids to avoid influencing subsequent reactions.

[0013]

Examples of protection groups for the amino groups of starting material amino acids include Z, Boc, tertiary-pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulfenyl, diphenylphosphinothioyl, and Fmoc. Examples of protection groups for carboxyl groups include those in which R is a C<sub>1-6</sub> alkyl group, C<sub>3-8</sub> cycloalkyl group, or C<sub>7-14</sub> aralkyl group, as well as 2-adamantyl, 4-nitrobenzyl, 4-methoxybenzyl, and 4-chlorobenzyl, phenacyl groups, and benzyloxycarbonylhydrazide, tertiary-butoxycarbonylhydrazide, and tritylhydrazide.

The hydroxyl groups of serine and threonine can be protected, for example, by esterification or etherification. Examples of groups that are suitable for esterification include lower alkanoyl groups such as acetyl, allyl groups such as benzoyl, and carbon-derived groups such as benzyloxycarbonyl and ethoxycarbonyl. Examples of groups that are suitable for etherification include benzyl, tetrahydropyranyl, and tertiary-butyl groups.

Examples of protection groups for phenolic hydroxyl groups of tyrosine include Bzl, Cl<sub>2</sub>-Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, and tertiary-butyl.

Examples of protection groups for imidazoles of histidine include Tos, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl, DNP, benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, and Fmoc.

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Examples for activated carboxyl groups in the starting material include corresponding acid anhydrides, azides, and active esters (esters with alcohols (e.g., pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, para-nitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, N-hydroxyphthalimide, and HOBt)). Examples for activated amino groups in the starting material include the corresponding phosphoric amides.

[0014]

Methods for removing (eliminating) protection groups include direct contact reduction in a hydrogen flow in the presence of a catalyst such as Pd black or Pd carbon, acid treatment with anhydrous hydrogen fluoride, methanesulfonic acid, trifluoromethanesulfonic acid, trifluoroacetic acid, or mixtures thereof, base treatment with diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine, or piperazine, or reduction with sodium in liquid ammonia. The eliminating reaction by acid treatment above performed at a temperature of -20 to 40°C, but it is effective to add a cation scavenger such as anisol, phenol, thioanisol, meta-cresol, para-cresol, dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol, or 1,2-ethanedithiol. 2,4-dinitrophenyl used as a imidazole protection group for histidine can be removed by treatment with thiophenol, while formyl groups used as indole protection groups for tryptophan can be removed by acid treatment in the presence of the aforementioned 1,2-ethanediol, 1,4-butanedithiol, or the like, and can also be removed by alkali treatment with diluted sodium hydroxide, diluted ammonia, or the like.

Methods for introducing protection groups to functional groups which are not to be involved in the reaction, the elimination of such protection groups, the activation of functional groups involved in the reaction, and the like should be managed by publicly known methods or modification thereof.

[0015]

In another method for obtaining an amide form of betacellulose mutated molecules, the  $\alpha$ -carboxyl group of the carboxyl terminal amino acid is first amidated, the peptide chain is then extended to the desired length to the amino group side, a peptide except for only the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

protection groups for the  $\alpha$ -amino groups on the N terminal of the peptide chain and a peptide (or amino acid) except for only the protection groups for the carboxyl groups on the C terminal are then prepared, and the two peptides are allowed to undergo condensation in a solvent mixture such as the above. The details of the condensation are the same as above. After the protected peptides resulting from the condensation have been purified, all the protection groups can be removed by the methods described above to obtain the desired crude polypeptide. The crude polypeptide can be purified through a variety of known purification techniques, and the main fractions can be lyophilized, giving the desired amide form of the polypeptides.

To obtain the ester form of betacellulin mutated molecules, the  $\alpha$ -carboxyl groups of the amino acids on the carboxyl terminal undergo condensation with a desired alcohol to produce an amino acid ester, and the desired ester form of the polypeptides can then be obtained in the same manner as the amide form.

[0016]

Examples of DNA encoding the betacellulin mutated molecules in the present invention include any DNA comprising DNA encoding (1) a betacellulin mutated molecule in which 1 to 30 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted, and 1 to 5 amino acid residues may be inserted between the 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> amino acid residues from the C terminal, (2) a betacellulin mutated molecule having an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 2.

Specific examples include those with a base sequence encoding a betacellulin mutated molecule containing an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 4 in the present invention.

More specific examples include (1) DNA containing DNA with a base sequence represented by SEQ ID NOs: 5 through, (2) DNA which hybridize with the sequences specified in (1) under the stringent condition, and (3) DNA which does not form hybrids with the sequences specified in (1) and (2) because of genetic code degeneracy but which codes for a polypeptide having the same amino acid sequence. Hybridization can be performed by publicly known methods or modification thereof. The

THIS PAGE BLANK (USPTO)

stringent conditions described above include, for example, a temperature of 42°C, 50% formamide, 4 × SSPE (1 × SSPE = 150 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA, pH 7.4), 5 × Denhardt's solution, and 0.1% SDS.

[0017]

Expression vectors for the betacellulin mutated molecules of the present invention, which are used when the betacellulin mutated molecules of the present invention are manufactured by culturing the transformants comprising DNA encoding betacellulin, can be manufactured, for example, by (1) excising target DNA fragments from the DNA encoding a betacellulin mutated molecule of the present invention, and (2) ligating the DNA fragments downstream of a promoter in a suitable expression vector.

Examples of vectors include *E. coli* plasmids (e.g., pBR322, pBR325, pUC12, and pUC13), *Bacillus subtilis* plasmids (e.g., pUB110, pTP5, and pC194), yeast plasmids (e.g., pSH19 and pSH15), bacteriophages such as λ phages, and animal viruses such as retroviruses, vaccinia viruses, and baculoviruses.

Examples of promoters which may be used include any suitable promoters corresponding to the host used to express the gene.

[0018]

When the host is an animal cell during transformation, it can be beneficial to use an SV40-derived promoter, retrovirus promoter, metallothionein promoter, heat shock promoter, cytomegalovirus promoter, SRα promoter, or the like. Preferred examples for *E. coli* hosts include the trp promoter, T7 promoter, lac promoter, recA promoter, λPL promoter, lpp promoter, and the like, preferred examples for *Bacillus* hosts include the SPO1 promoter, SPO2 promoter, penP promoter, and the like, and preferred examples for yeast hosts include the PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH1 promoter, GAL promoter, and the like. When the host is an insect cell, polyhedrin promoters and P10 promoters, etc. are preferred.

In addition to the above, expression vectors can also include enhancers, splicing signals, polyA signals, selection markers, SV40 origin of replication (henceforth, sometimes also referred to as SV40ori), and the like as desired. Examples of selection markers

THIS PAGE BLANK (USPTO)

include the dihydrofolate reductase (dhfr) gene (methotrexate (MTX) resistance), the ampicillin resistance gene (Amp<sup>r</sup>), and the neomycin resistance gene (G418 resistance, sometimes referred to as Neo). Thymidine-free media can be used for selection, particularly in cases where the DHFR gene is used as the selection marker with CHO (dhfr<sup>-</sup>) cells.

A signal sequence adapting the host may be added to the N terminal side of the betacellulin mutated molecule as needed. Preferred examples include a phoA signal sequence, OmpA signal sequence, or the like for *E. coli* hosts. Preferred examples include an  $\alpha$ -amylase signal sequence, subtilisin signal sequence or the like for *Bacillus* hosts. Preferred examples include a mating factor  $\alpha$ (MF $\alpha$ ) signal sequence, invertase signal sequence, or the like for yeast hosts. Preferred examples include an insulin signal sequence,  $\alpha$ -interferon signal sequence, antibody molecule signal sequence, or the like for animal cell hosts.

A vector constructed in this manner, containing DNA encoding a betacellulin mutated molecule, can be used to manufacture transformants.

[0019]

Hosts which can be used include, for example, *E. coli*, *Bacillus*, yeasts, insects or insect cells, and animal cells.

Examples of *E. coli* include *E. coli* K12 DH1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60:160 (1968)), JM103 (*Nucleic Acids Research*, 9:309 (1981)), JA221 (*Journal of Molecular Biology*, 120:517 (1978)), HB101 (*Journal of Molecular Biology*, 41:459 (1969)), C600 (*Genetics*, 39:440 (1954)), and MM294 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:4174 (1976)).

Examples of *Bacillus* include *Bacillus subtilis* MI114 (*Gene*, 24:255 (1983)), and 207-21 (*Journal of Biochemistry*, 95:87 (1984)).

Examples of yeasts include *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, and 20B-12.

Examples of insects include silkworm larvae (Maeda et al., *Nature*, 315:592 (1985)).

Examples of insect cells include, in the case of the AcNPV virus, established cell lines derived from larvae of *Spodoptera frugiperda* (Sf cells), MG1 cells derived from *Trichoplusia ni* mid-gut cells, High Five™ cells derived from *Trichoplusia ni* ovarian cells, cells derived from

THIS PAGE BLANK (USPTO)



*Mamestra brassicae*, and cells derived from *Estigmena acrea*. Examples for when the virus is BmNPV include established cell lines derived from *Bombyx mori* N (BmN cells). Examples of Sf cells include Sf9 cells (ATCC CRL1711) and Sf21 cells (J.L. Vaughn et al., *in Vitro*, Vol. 13, pp. 213-217 (1977)).

Examples of animal cells include monkey COS-7 cells, Vero cells, Chinese hamster cells CHO, DHFR gene-deficient Chinese hamster cells CHO (dhfr<sup>-</sup>CHO cells), mouse L cells, mouse 3T3 cells, mouse myeloma cells, human HEK293 cells, human FL cells, 293 cells, C127 cells, BALB3T3 cells, and Sp-2/O cells.

[0020]

*E. coli* can be transformed, for example, by a method described in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110 (1972) or *Gene*, 17:107 (1982).

*Bacillus* can be transformed, for example, by a method described in *Molecular & General Genetics*, 168:111 (1979).

Yeasts can be transformed, for example, by a method described in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929 (1978).

Insect cells and insects can be transformed, for example, by a method described in *Bio/Technology*, 6, pp. 47-55 (1988).

Animal cells can be transformed, for example, by a method described in *Virology*, 52:456 (1973).

Examples of methods for introducing expression vectors into cells include lipofection method (P.L. Felgner et al. in *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 84, p. 7413 (1987)), calcium phosphate method (F.L. Graham and A.J. van der Eb in *Virology*, Vol. 52, pp. 456-467 (1973)), electroporation (E. Nuemann et al. in *EMBO J.*, Vol. 1, pp. 841-845 (1982)) and the like.

Transformants which have been transformed in expression vectors containing DNA encoding the betacellulin mutated molecules of the present invention can be obtained in this manner.

[0021]

In one method for stable expression of the betacellulin mutated molecules of the present invention using animal cells, cells incorporating an expression vector introduced into the aforementioned animal cells to chromosome are selected by clone selection.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Specifically, transformants are selected using the aforementioned selection markers as indicators. It is also possible to obtain stable animal cell lines with a high expression capacity for the betacellulin mutated molecules of the present invention etc. through repeated clone selection of animal cells obtained using selection markers in this manner. When a dhfr gene is used as a selection marker, culture can be carried out as the MTX concentration is gradually increased, and resistant strains can be selected so that intracellular amplification of DNA encoding the betacellulin mutated molecules of the present invention together with the dhfr gene gives an animal cell line with even higher expression.

[0022]

The betacellulin mutated molecules of the present invention can be manufactured by culturing the aforementioned transformants under conditions allowing the expression of DNA encoding the betacellulin mutated molecules of the present invention, and producing and accumulating the betacellulin mutated molecules of the present invention.

When culturing transformants with *E. coli* or *Bacillus* hosts, liquid media are suitable for the culture, and can contain carbon sources, nitrogen sources, inorganic material, and other materials necessary for the growth of the transformants. Carbon sources include glucose, dextrans, soluble starches, and sucrose, and nitrogen sources include inorganic or organic substances such as ammonium salts, nitrates, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, soybean cake, and potato extract. Examples of inorganic materials include calcium chloride, sodium dihydrogen phosphate, and magnesium chloride. Yeasts, vitamins, growth promoting factors, and the like may also be added. The medium pH is preferably about 5 to 8.

A preferred media for culturing *E. coli* is M9 medium containing glucose and casamino acid (Miller, *Journal of Experiments in Molecular Genetics*, pp. 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)). A chemical such as 3 $\beta$ -indoleacrylic acid can be added to enhance the promoter as needed.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In cases where the host is *E. coli*, the culture usually takes about 3 to 24 hours at about 15 to 43°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

In cases where the host is *Bacillus*, the culture usually takes about 6 to 24 hours at about 30 to 40°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

Examples of media for the culture of transformants with yeast hosts include Burkholder minimum medium (K.L. Bostian et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 77, 4505 (1980), and SD medium containing 0.5% casamino acid (G.A. Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, 5330 (1984)). The medium pH may preferably be adjusted to between about 5 and 8. The culture usually takes about 24 to 72 hours at about 20 to 35°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

Examples of media for the culture of transformants with insect cell hosts include Grace's Insect Medium (T.C.C. Grace, *Nature*, 195:788 (1962) suitably supplemented with additives such as 10% immobilized bovine serum. The medium pH should be adjusted to between about 6.2 and 6.4. The culture usually takes about 3 to 5 days at about 27°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

[0023]

Examples of media for the culture of transformants with animal cell hosts include MEM medium containing about 5 to 20% fetal calf serum (*Science*, 122:501 (1952)), DMEM medium (*Virology*, 8:396 (1959)), RPMI 1640 medium (*The Journal of the American Medical Association*, 199:519 (1967)), and 199 medium (*Proceedings of the Society for Biological Medicine*, 73:1 (1950)). The pH may preferably be about 6 to 8. The culture was usually performed for 15 to 60 hours at about 30 to 40°C. The culture can be aerated or stirred as needed.

Particularly when CHO (dhfr<sup>-</sup>) cells and dhfr genes are used as selection markers, DMEM medium containing dialyzed fetal calf serum with virtually no thymidine is preferably used.

[0024]

The betacellulin mutated molecules of the present invention can be isolated and purified from the aforementioned cultures in the following manner, for example.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

When the betacellulins of the present invention are extracted from cultured bacterial cells or cells, the bacterial cells or cells are collected by a publicly known method after completion of the culture and are suspended in a suitable buffer, they are disrupted by ultrasonication, lysozyme treatment and/or by freezing and thawing, etc., and the polypeptide crude extract is then obtained by centrifugation or filtration. The buffer may also contain a protein denaturant such as urea or guanidine hydrochloride, or a surfactant such as Triton X-100 (registered trademark (™)).

When betacellulin mutated molecules are secreted in the culture broth, the bacterial cells or cells are separated from the supernatant by a publicly known method after completion of the culture, and the supernatant is collected.

The polypeptides of the present invention contained in the extract or culture supernatant obtained in this manner can be purified by a suitable combination of publicly known methods of isolation and purification. Examples of such publicly known methods of isolation and purification include methods utilizing the degree of dissolution such as solvent precipitation or salting out, methods utilizing differences primarily in molecular weight such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, methods making use of differences in charge such as ion exchange chromatography, methods utilizing specific affinity such as affinity chromatography, methods utilizing hydrophobic differences such as reverse phase HPLC, and methods utilizing differences in isoelectric point, such as isoelectric point electrophoresis and chromatofocusing.

When the resulting betacellulin mutated molecules of the present invention are obtained in free form, they can be converted to a salt by a publicly known method or a modification thereof. Alternatively, when they are obtained in the form of a salt, they can be converted to free form or another salt by a publicly known method or a modification thereof.

Betacellulin mutated molecules of the present invention produced by recombinants can be modified as desired through the action of suitable protein-modifying enzymes before or after purification, or the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



betacellulin mutated molecules can be partially removed. Examples of protein-modifying enzymes include trypsin, chymotrypsin, arginylendopeptidase, protein kinase, and glycosidase.

The resulting betacellulin mutated molecules may be treated in a refolding step as described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989, for example. Betacellulin mutated molecules with an N terminal Met can be subjected to a reaction for removing the Met from the N terminal as described in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989 in order to remove the N terminal Met.

The presence of the resulting betacellulin mutated molecules of the present invention can be determined by enzyme immunoassay or the like using specific antibodies.

[0025]

Because the betacellulin mutated molecules or their salts in the present invention or DNA encoding them have reduced EGF activity and no problems in terms of antigenicity, they can be useful as safe and low toxic drugs. The betacellulin mutated molecules or their salts in the present invention or DNA encoding them can be used as drugs to improve diseases such as diabetes (such as insulin-dependent diabetes), pancreatic dysfunction associated with diabetes, and pancreatic dysfunction associated with insufficient insulin secretion in the elderly, and as therapeutic and prophylactic drugs for diseases such as undifferentiated pancreatic cancer.

The betacellulin mutated molecules or salts in the present invention or DNA encoding them can be used in the conventional manner as the aforementioned drugs. For example, they can be orally administered in the form of coated or enterically coated tablets, capsules, elixirs, microcapsules, and the like, and can be parenterally administered in the form of injections such as sterile solutions with water or other pharmaceutically acceptable liquids, or suspensions. Such preparations can be manufactured, for example, by mixing the compounds or salt in unit dose formulations required for generally recognized preparations, along with physiologically permissible carriers, flavorings, excipients, vehicles, antiseptics, stabilizers, binders, and the like. The content

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of the active ingredient in such formulations will give a suitable dose within the indicated range.

[0026]

Examples of additives which can be miscible with tablets, capsules, and the like include binders such as gelatin, corn starch, tragacanth gum, and gum arabic, excipients such as crystalline cellulose, swellings such as corn starch, gelatin, and alginic acid, lubricants such as magnesium stearate, sweeteners such as sucrose, lactose, and saccharin, and flavors such as peppermint, Akamono oil, or cherry. In the case of unit formulations in the form of capsule preparations, the material can also include a liquid carrier such as a lipid. Sterile compositions for injections can be formulated by a common method such as dissolving or suspending a naturally produced vegetable oil or the like such as sesame oil or coconut oil and the active ingredient in a vehicle such as water for injection.

Examples of aqueous solutions for injection include physiological saline, isotonic liquids containing glucose or other adjuvants (such as D-sorbitol, D-mannitol, and sodium chloride). Suitable dissolving aids such as alcohols (such as ethanol), polyalcohols (such as propylene glycol and polyethylene glycol), and nonionic surfactants (such as Polysorbate 80™ and HCO-50) can also be used. Examples of oleaginous solutions include sesame oil and soybean oil. Examples of dissolution aids include benzyl benzoate and benzyl alcohol.

Buffers (such as phosphate buffers and sodium acetate buffers), analgesics (such as benzalkonium and procaine hydrochloride), stabilizers (such as human serum albumin and polyethylene glycol), preservatives (such as benzyl alcohol and phenol), antioxidants, and the like can also be blended. Injections are usually packaged in suitable ampules.

The resulting preparation is safe and has low toxicity, and can thus be administered, for example, to mammals (such as human, mice, rats, guinea pigs, rabbits, sheep, pigs, cows, cats, dogs, monkeys, sacred baboons, and chimpanzees).

The dosage of the betacellulin mutated molecule or salt thereof in the present invention varies depending on the subjects condition, etc.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

The orally administered dosage for patients with adult diabetes (per 60 kg body weight) is generally about 0.1 to 100 mg per day, preferably about 1.0 to 50 mg, and even more preferably about 1.0 to 20 mg. The parenterally administered dosage at a time varies depending on the purpose of administration, the target organ, the subject's condition, the method of administration, and so forth. Intravenous injections, for example, for patients with adult diabetes (per 60 kg body weight) are generally about 0.01 to 30 mg per day, preferably about 0.1 to 20 mg, and even more preferably about 0.1 to 10 mg. The dosage for other mammals can also be calculated in terms of 60 kg.

[0027]

Abbreviations for bases, amino acids, and the like in the Specification and figures are based on the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature and on abbreviations common in the field. Examples are given below. Optical isomers of amino acids are the L form, unless otherwise specified.

DNA: deoxyribonucleic acid

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

A: adenine

T: thymine

G: guanine

C: cytosine

EDTA: ethyleendiaminetetraacetic acid

APMSF: (p-amidinophenyl) methanesulfonylfluoride hydrochloride

SDS: sodium dodecylsulfate

TFA: trifluoroacetic acid

Gly: glycine

Ala: alanine

Val: valine

Leu: leucine

Ile: isoleucine

Ser: serine

Thr: threonine

Cys: cysteine

Met: methionine

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Glu: glutamic acid  
Asp: aspartic acid  
Lys: lysine  
Arg: arginine  
His: histidine  
Phe: phenylalanine  
Tyr: tyrosine  
Trp: tryptophan  
Pro: proline  
Asn: asparagine  
Gln: glutamine  
NMP: N-methylpyrrolidone  
[0028]

Substituents, protection groups, and reagents used in the Specification are represented by the following symbols.

Me: methyl group  
Et: ethyl group  
Bu: butyl group  
Ph: phenyl group  
TC: thiazolidine-4(R)-carboxamide group  
Bom: benzyloxymethyl  
PAM: phenylacetamide methyl  
Tos: p-toluenesulfonyl  
HONB: N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxyimide  
Bzl: benzyl group  
Z: benzyloxycarbonyl group  
Br-Z: 2-bromobenzyloxycarbonyl group  
Cl-Z: 2-chlorobenzyloxycarbonyl group  
Boc: t-butyloxycarbonyl group  
HOBt: 1-hydroxybenztriazole  
DCC: N,N'-dicyclohexylcarbodiimide  
TFA: trifluoroacetic acid  
Fmoc: N-9-fluorenylmethoxycarbonyl group  
DNP: dinitrophenyl group  
Bum: tertiary butoxymethyl group

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Trt: trityl group

[0029]

The SEQ ID NOs: in the Sequence Listing in the specification indicate the following sequences.

SEQ ID NO: 1

Amino acid sequence of betacellulin mutated molecule (BTC31-58, Asn, Pro, Ser, 59-80) of the present invention

SEQ ID NO: 2

Amino acid sequence of betacellulin mutated molecule (Asn, Ser, Asp, Ser, Glu, BTC38-80) of the present invention

SEQ ID NO: 3

Amino acid sequence of betacellulin

SEQ ID NO: 4

Amino acid sequence of betacellulin mutated molecule (BTC1-58, Asn, Pro, Ser, 59-80) of the present invention

SEQ ID NO: 5

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutated molecule represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4

SEQ ID NO: 6

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutated molecule represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO: 7

Base sequence of cDNA encoding betacellulin mutated molecule represented by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2

SEQ ID NO: 8

Base sequence of primer BT-95h used in Reference Example 1 and Example 1 below

SEQ ID NO: 9

Base sequence of primer BT-94h used in Reference Example 1 and Example 2 below

SEQ ID NO: 10

Base sequence of primer PET-1 used in Example 1 below

SEQ ID NO: 11

Base sequence of primer BTC-1 used in Example 1 below

SEQ ID NO: 12

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Base sequence of primer BTC-2 used in Example 1 below

SEQ ID NO: 13

Base sequence of primer BTC-3 used in Example 1 below

SEQ ID NO: 14

Base sequence of primer BTC-7 used in Example 2 below

SEQ ID NO: 15

Base sequence of primer RI-1 used in Test Example 3 below

SEQ ID NO: 16

Base sequence of primer RI-3 used in Test Example 3 below

SEQ ID NO: 17

Base sequence of primer RI-1C1a used in Test Example 3 below

SEQ ID NO: 18

Base sequence of primer RI-3Xho used in Test Example 3 below

[0030]

The *E. coli* MM294 (DE3)/pLysS, pTB1516 with the plasmid pTB1516 obtained in Reference Example 1 below was registered under the Accession No. FERM BP-3836 on April 21, 1992 at the National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (NIBH). It was also registered under the Accession No. IFO 15282 on April 16, 1992 at the Institute for Fermentation.

[0031]

[Examples]

#### Reference Example 1

Construction of 50-residue human betacellulin (hBTC50) expression plasmid pTB1976

The pTB1516 plasmid incorporating the cDNA of 80-residue hBTC (Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H6-87894; Accession No. FERM BP-3836, Accession No. IFO 15282) was used as template in PCR using the BT-95h primer (5'-AGCATATGCGGAAAGGCCACTTCTCTAGGT-3') and the BT-94h primer (5'-CTGGATCCTAGTAAACAAGTCAACTCTCT-3'). PCR products with a translation start codon and NdeI site in the 5' terminal of the C terminal 50-residue type hBTC, and a stop codon and a BamHI site inserted at the 3' terminal, were digested with NdeI and BamHI, and were inserted using the DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara) to the NdeI-BamHI

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

site of the pET-3c expression plasmid (Novagen) having the  $\Phi 10$  promoter of the T7 phage, so as to prepare the pTB1976 plasmid for the expression of hBTC50. The base sequence of the inserted cDNA was confirmed by an ABI DNA sequencer (ABI377 DNA Sequencer).

Figure 1 is a schematic of the construction of the pTB1976 plasmid.

[0032]

#### Example 1

Construction of hBTC50 mutated molecule A expression plasmid pTB1985 incorporating 3 heregulin (Her)-derived residues between Cys3-Cys4

PCR was carried out with pTB1976 as template using (1) a 5' side primer PET-1 (5'-GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG-3') and a 3' side primer BTC-1 (5'-AGGAGGGCGTCGAGGGGTTCTGCTCGGCCA-3') and (2) 5' side primer BTC-2 (5'-TGGCCGAGCAGAACCCCTCGACGCCCTCCT-3') and a 3' side primer BTC-3 (5'-TCTATGCGCACCCGTTCTCGGAGCACTGTC-3').

A mixture of the PCR products of (1) and (2) was used as template for PCR using a 5' side primer BT-95h and a 3' side primer BT-94h, giving DNA fragments encoding mutated molecule A with 3 amino acids (Asn, Pro, Ser) of the Her sequence inserted between the Cys3-Cys4 of hBTC50. The DNA fragment was digested with NdeI and BamHI, and then inserted into the NdeI-BamHI position of pET-3c to prepare pTB1985.

[0033]

#### Example 2

Construction of hBTC50 mutated molecule B expression plasmid pTB1987 with seven N terminal residues substituted by five residues of epithelial growth factor (EGF) in the corresponding positions

pTB1976 was used as template in PCR using a 5' side primer BTC-7 (5'-TATACATATGAACAGCGACTCTGAGTGCCCCAAGC-3') and the 3' side primer BT-94h, giving DNA fragments encoding mutated molecule B in which seven N terminal residues of hBTC50 were substituted with five corresponding EGF residues. The DNA fragment was digested with NdeI and BamHI, and then incorporated into the NdeI-BamHI position of pET-3c to prepare pTB1987.

[0034]

#### Example 3

Expression in *E. coli*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The pTB1976 plasmid, pTB1985 plasmid, and pTB1987 prepared in the following reference examples and above examples were introduced into *E. coli* BL21(DE3)pLyss (Novagen) for expression under the control of the  $\Phi$ 10 promoter of the T7 phage. The various *E. coli* recombinants were cultured at 37°C using LB medium containing 100 µg/mL ampicillin and 10 µg/mL chloramphenicol. When the turbidity reached 160 Klett units, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside was added to a final concentration of 0.4 mM, and the culture was continued for another 4 hours at 37°C. Cells were harvested by centrifugation and stored at -80°C until extraction.

[0035]

#### Example 4

##### Purification of hBTC50, Mutein A and Mutein B

##### 4-1) Preparation of *E. coli* inclusion bodies

Cells harvested from 400 mL of culture broth were suspended in 20 mL of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% sucrose, and 10 mM EDTA, followed by freezing and thawing. The cells were then allowed to stand for 30 minutes in ice and were completely lysed. They were disrupted by ultrasonication (3 times for 10 sec) while cooled on ice and then centrifuged (15 min at 9000 rpm and a temperature of 4°C; Beckman), and the precipitate was again collected. These washing operations were repeated three times to prepare inclusion bodies.

##### 4-2) Protein extraction and refolding

The inclusion bodies prepared in 4-1) were suspended in 8 mL of 7M guanidine-HCl, 0.1 M Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH 8.0), and 1 mM EDTA, and they were gently stirred with a stirrer for 1 hour at 4°C to extract the recombinant protein. Reduced type glutathione was added to 0.1 M, the pH was adjusted to 8.4 with NaOH solution, and nitrogen gas was blown into the extract to displace the air. The extract was allowed to stand for 2 hours at room temperature, and was then diluted with 20 volumes of 10 mM Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH 8.0), 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM benzamidine. The diluted extract was centrifuged (9000 rpm, 15 min, 25°C) to remove the insoluble material, oxidized type glutathione was added to a concentration of 0.5 mM to the supernatant, and the solution was allowed to stand for 16 hours at room temperature. The supernatant



THIS PAGE BLANK (USPTO)



(9000 rpm, 15 min, 25°C) was lyophilized and concentrated, and then dialyzed (Spectrapor: MWCO 1,000) against 50 mM Tris-CH<sub>3</sub>COOH (pH 5.5) and 1 mM EDTA at 4°C. After the dialysis, the supernatant (9000 rpm, 15 min, 4°C) was filtrated with an acetate cellulose membrane (Millex GV, 0.22 µm: Millipore) to remove the insoluble material.

#### 4-3) Purification of protein

Solution containing refolded protein was loaded on a cation exchange HPLC column (250 × 4.1 mm, I.d., Synchrom CM300, Synchropak) equilibrated with 50 mM sodium acetate (pH 5.5), and was eluted with a 0 to 1 M NaCl gradient to obtain fractions. Eluted fractions observed at OD<sub>280</sub> were loaded on a C<sub>4</sub> reverse HPLC column (150 × 4.6 mm I.d., Ultron 300 C<sub>4</sub>: Chromatopacking Center) equilibrated with 0.1% HCl and 1% CH<sub>3</sub>CN, and were eluted with a 1 to 40% CH<sub>3</sub>CN gradient. The peak fractions obtained by column chromatography were then lyophilized. The yields of Muteins A and B were 78.7 and 103.1 µg, respectively.

#### 4-4) Determination of protein purity

To determine the purity of the purified product, the product was loaded on a C<sub>18</sub> reverse phase HPLC column (150 × 4.6 mm i.d., ODS120T, Tosoh), and was eluted with a 15 to 30% CH<sub>3</sub>CN gradient, confirming the identity of the peak proteins of Muteins A and B. Both proteins had a purity of 94% or more.

[0036]

#### Test Example 1

Assay of cell growth promoting activity using 3T3 cells

The cell growth promoting activity was assayed by means of the <sup>3</sup>H-thymidine uptake into stationary 3T3 A31-714 Clone 4 (*International Journal of Cancer*, 12:463 (1973)) as described in *Molecular Cell Biology*, 8:588 (1988).

100 µL 3T3 A31-714 Clone 4 suspended to 1000 cells/mL using Dulbecco's modified Eagle MEM medium containing 5% bovine serum were seeded to 96 well plates and cultured for a day at 37°C in carbon dioxide gas incubators (5% carbon dioxide gas, 95% air). 75 µL of supernatant was taken, and 100 µL of serum-free Dulbecco's modified Eagle MEM medium was added to adjust the serum concentration to 1%. Two more days of culture was followed by the addition of varying

THIS PAGE BLANK (USPTO)

concentrations of the hBTC50, Mutein A, or Mutein B prepared in the above examples. 16 hours after these had been added,  $^3\text{H}$ -thymidine (Amersham Pharmacia Biotech) was added in an amount of 0.25  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ , after 4 hours the cells were washed 3 times with PBS, 100  $\mu\text{L}$  of 5% SDS was added, and the cells were lysed. The cell lysate was transferred to scintillation vials, 1 mL of Scintillator A (Wako Pure Chemicals) was added, and the uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine into the cell was assayed with a scintillation counter.

Table 1 gives the results of the concentrations of hBTC50 and the mutated molecules showing 50% activity ( $\text{ED}_{50}$ ), where 100% is the maximum uptake of the 80-residue betacellulin (reference).

Table 1: cell growth promoting activity

Sample	$\text{ED}_{50}$ (nM)
hBTC50	0.01
Mutein A	0.6
Mutein B	>10.0

[0037]

#### Test Example 2

Assay of  $\beta$  cell differentiation promoting activity using AR42J cells

Cells of the AR42J cell line derived from pancreatic cancer induced by chemical carcinogens (Christophe, *Am. J. Physiol.*, 266:G963 (1994)) were suspended to a concentration of  $10^5$  cells/mL in Dulbecco's modified Eagle MEM medium containing 10% fetal calf serum and one of hBTC50, Mutein A, Mutein B, or the 80-residue betacellulin (hBTC80) prepared in accordance with the method in Japanese Unexamined Patent Application (Kokai) H10-191989. 500  $\mu\text{L}$  of these suspensions was inoculated on chamber slides and incubated for 5 days at  $37^\circ\text{C}$  in carbon dioxide gas incubators (5% carbon dioxide gas, 95% air). After 5 days, the cells were washed once with PBS, fixed in 10% formaldehyde, and treated for 5 min with 0.1% Triton X-100. Block Ace (Snow Brand, Japan) was then added for 40 minutes of blocking at room temperature. Anti-insulin antibodies (by Advanced Immunochemicals) diluted with 10% Block Ace were added, and reacted for 40 minutes at room temperature. 0.1%

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Triton X-100 was added, the reaction solution was allowed to stand for 5 minutes at room temperature, and the cells were then washed three times with PBS. FITC (fluorescein isothiocyanate) labeled anti-mouse IgG antibodies (Cappel) diluted with 10% Block Ace were added, and a reaction was brought about for 40 minutes. 0.1% Triton X-100 was added, the reaction solution was allowed to stand for 5 minutes, the cells were then washed three times with PBS, and they were then observed under a fluorescent microscope.

Stained cells, that is, cells which had differentiated into insulin-producing  $\beta$  cells, were found in all cases involving the addition of hBTC50 and Muteins A and B, as was the case when hBTC80 was added.

There were no differences in the incidence of insulin-producing cells between hBTC80, hBTC50, and Muteins A and B.

[0038]

#### Test Example 3

Assay of  $\beta$  cell differentiation promoting activity using PLAP expression AR42J cells

##### 3-1) Construction of human placenta alkaline phosphatase gene expression vector

The differentiation promoting activity into  $\beta$  cells was also determined using AR42J cells transformed with the vector having alkaline phosphatase which had been ligated as a reporter downstream of the insulin promoter. Specifically, cells which have differentiated into  $\beta$  cells by addition of betacellulin produce alkaline phosphatase. As a result, by assaying the alkaline phosphatase activity, the differentiation promoting activity into  $\beta$  cells can be quantitatively assayed.

Genomic DNA was prepared in the conventional manner from rat tail. The 0.75 kb insulin promoter region was amplified by PCR with a primer RI-1 (5'-AGAGTCAAGGATCCCCCAACCACT-3') and a primer RI-3 (5'-AGCTGGTCACTTAGGGCTGGGG-3') based on the base sequence of the well known rat insulin II gene promoter (GenBank: Accession No. J00748) using the genomic DNA as template. PCR was also carried out using primers RI-1Cla (5'-GAATCGATAGAGTCAAGGATCCCCCA-3') and RI-3Xho

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(5'-GACTCGAGCTGGTCACTTAGGG-3') using the PCR product as template. The amplified 0.75 kb DNA fragments were isolated, and the pTB1881 plasmid obtained upon insertion into the pT7 Blue vector (Novagen 69820-1) was used to sequence the base sequence of the cloned fragments, confirming that they were the rat insulin II promoter. The pTB1881 plasmid was digested with XhoI-ClaI, giving 0.73 kb DNA fragments (rat insulin promoter). The pTB1330 plasmid for the expression of 2.0 kb cDNA (J. Berger et al., *Gene*, 66, 1 (1988)) encoding human placenta alkaline phosphatase (PLAP) was digested with XhoI-HindIII. The resulting 2.7 kb DNA fragments (PLAP cDNA, containing an SV40-derived splicing site and polyA addition site, pBR322-derived ori, and ampicillin resistance gene) were isolated, and the aforementioned rat insulin promoter region 0.73 kb XhoI-ClaI fragment was ligated by T4 DNA ligase reaction, giving the plasmid pTB1898.

[0039]

### 3-2) Construction of PLAP expression AR42J cells

The pMCneopolyA plasmid (Stratagene) containing the neo<sup>r</sup> gene of Tn5 and the PLAP expression plasmid pTB1898 were simultaneously introduced into AR42J cells using the transfection reagent TransIT<sup>™</sup>-LT1 (Mirus, PenVera Corporation). The incorporated cells were then cultured for 2 days in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, and the culture was then continued in selection medium supplemented with 800 µg/mL G418 (geneticin, Gibco BRL). Clones were isolated by limiting dilution of cells growing with G418 resistance.

Cells of each clone were seeded on 24-well plates and cultured for 4 days with and without the addition of 20 ng/mL 80-residue BTC, the supernatant was collected and heat treated for 30 minutes at 65°C, and the alkaline phosphatase activity in the media was then assayed. Clones showing increased alkaline phosphatase activity with the addition of 80-residue betacellulin were selected. The AR71-104 clone was used below.

### 3-3) Assay of $\beta$ cell differentiation promoting activity using PLAP expression AR42J cells

PLAP expression AR42J cells constructed in 3-2) were suspended to a concentration of  $3 \times 10^4$  cells/mL in Dulbecco's modified Eagle MEM medium containing 10% fetal calf serum and on of varying concentrations

THIS PAGE BLANK (USPTO)



of the hBTC50 or Mutein A or B prepared above. 100  $\mu$ L of these suspensions were inoculated on 96-well plates and incubated for 5 days at 37°C in carbon dioxide gas incubators (5% carbon dioxide gas, 95% air). After 5 days, samples of the culture supernatant were treated for 30 minutes at 65°C, and 50  $\mu$ L was then added to 96-well microplates containing 50  $\mu$ L of 2XSEAP (2M diethanolamine, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM homoarginine). The samples were held for 10 minutes at 37°C, and 10  $\mu$ L of 20 mg/mL p-nitrophenylphosphoric acid (Sigma) was added, a reaction was brought about for 16 hours at 37°C, and the absorbance at 405 nm ( $A_{405}$ ) was determined.

Table 2 gives the protein concentration ( $ED_{50}$ ) necessary to show 50% activity, where 100% is the maximum absorbance when hBTC50 was added.

Table 2: activity inducing differentiation to  $\beta$  cells

Sample	$ED_{50}$ (nM)
hBTC50	0.15
Mutein A	0.5
Mutein B	0.7

[0040]

[Effect of the Invention]

The betacellulin mutated molecules and their salts of the present invention have reduced EGF activity and intact BTC activity, with no antigenicity-related problems. They are thus useful as better therapeutic drugs for diabetes.

[0041]

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Betacellulin Mutein

<130> A99028

<160> 18

<210> 1

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

Arg Lys Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys

5

10

15

Ile Lys Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr

20

25

30

Pro Ser Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg

35

40

45

Val Asp Leu Phe Tyr

50

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 45

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

5

10

15

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

20

25

30

Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

35

40

45

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 83

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

Asp Gly Asn Ser Thr Arg Ser Pro Glu Thr Asn Gly Leu Leu Cys Gly

1

5

10

15

Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

20

25

30

Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

35

40

45

Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Asn Pro Ser Thr Pro Ser

50

55

60

Cys Val Cys Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp

65

70

75

80

Leu Phe Tyr

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 249

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

GATGGGAATT CCACCAGAAG TCCTGAAACT AATGGCCTCC TCTGTGGAGA CCCTGAGGAA 60

AACTGTGCAG CTACCACCAC ACAATCAAAG CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG 120

CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGAACCCC 180

TCGACGCCCT CCTGTGTCTG TGATGAAGGC TACATTGGAG CAAGGTGTGA GAGAGTTGAC 240

TTGTTTTTAC

249

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 159

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 6

CGGAAAGGCC ACTTCTCTAG GTGCCCCAAG CAATACAAGC ATTACTGCAT CAAAGGGAGA 60  
TGCCGCTTCG TGGTGGCCGA GCAGAACCCC TCGACGCCCT CCTGTGTCTG TGATGAAGGC 120  
TACATTGGAG CAAGGTGTGA GAGAGTTGAC TTGTTTTAC 159

<210> 7

<211> 144

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 7

AACAGCGACT CTGAGTGCCC CAAGCAATAC AAGCATTACT GCATCAAAGG GAGATGCCGC 60  
TTCGTGGTGG CCGAGCAGAC GCCCTCCTGT GTCTGTGATG AAGGCTACAT TGGAGCAAGG 120  
TGTGAGAGAG TTGACTTGTT TTAC 144

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 50

AGCATATGCG GAAAGGCCAC TTCTCTAGGT 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 9

CTGGATCCTA GTAAAACAAG TCAACTCTCT 30

<210> 10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 10

GAAATAATTT TGTTTAACTT TAAGAAGGAG

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 11

AGGAGGGCGT CGAGGGGTTC TGCTCGGCCA

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 12

TGGCCGAGCA GAACCCCTCG ACGCCCTCCT

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

<400> 13

TCTATGCGCA CCCGTTCTCG GAGCACTGTC

30

<220>

<223>

<210> 14

<211> 35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 14  
TATACATATG AACAGCGACT CTGAGTGCCC CAAGC 35  
<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 15  
AGAGTCAAGG ATCCCCCAAC CACT 24  
<210> 16  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 16  
AGCTGGTCAC TTAGGGCTGG GG 22  
<210> 17  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 17  
GAATCGATAG AGTCAAGGAT CCCCCA 26  
<210> 18  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

<223>

<400> 18

GACTCGAGCT GGTCACCTAG GG

22

[0042]

[Brief Description of the Drawings]

[Figure 1] A schematic of the construction of plasmid pTB1976 in Reference Example 1.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



[Document] Abstract

[Abstract]

[Problem] To provide a better therapeutic drug for diabetes.

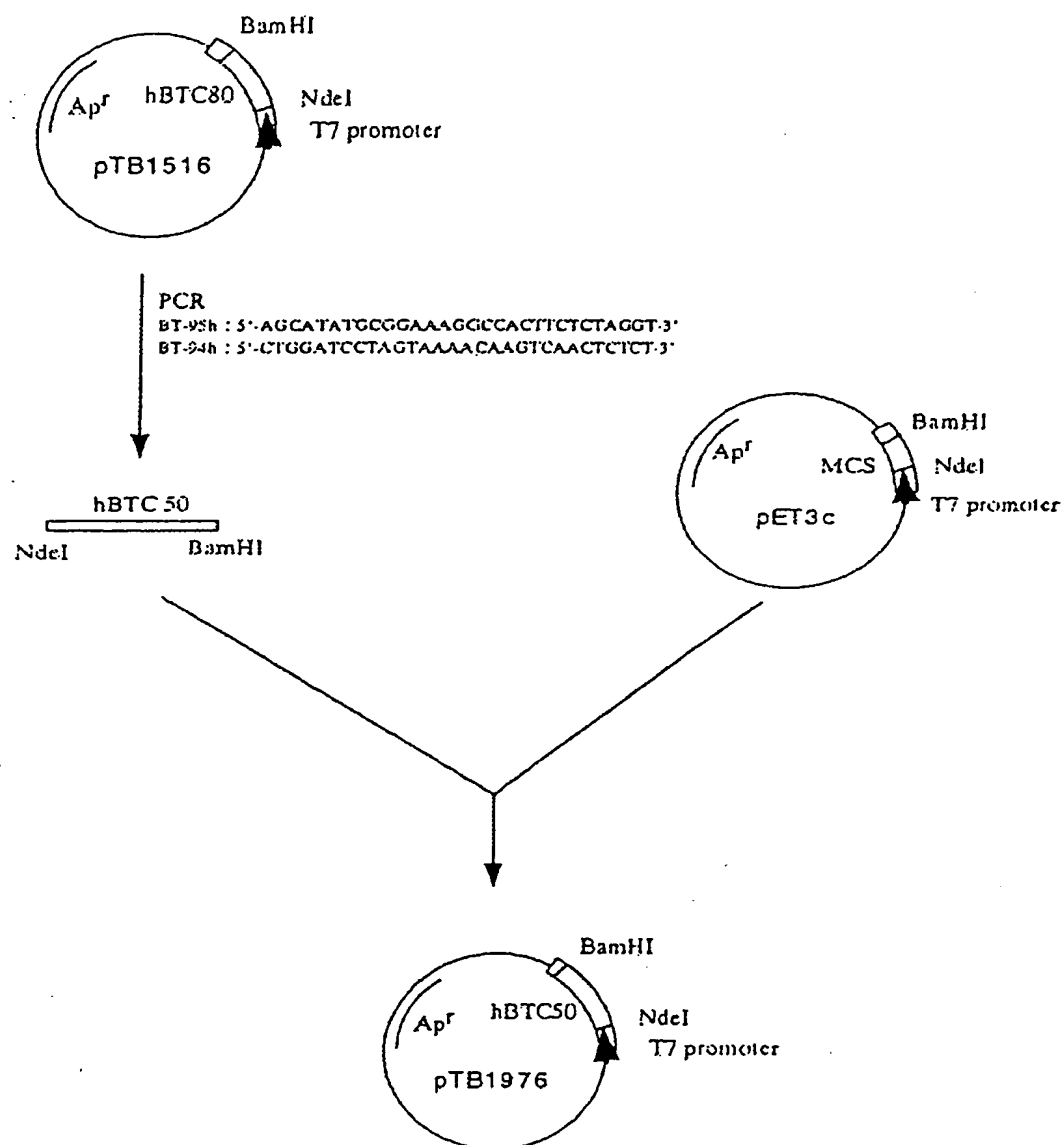
[Means for solving a problem] The betacellulin mutated molecule wherein 1 to 30 amino acid residues from the N terminal of the betacellulin may be deleted and 1 to 5 amino acid residues may be inserted between 22<sup>nd</sup> and 23<sup>rd</sup> amino acid residue from the C terminal, the betacellulin mutated molecule having an amino acid sequence represented by SEQ ID No: 2 or their salt of the present invention are useful for better therapeutic drug for diabetes, since they have intact BTC activity and reduced EGF activity.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



[Document] Drawing

[Fig.1]



Construction of hBTC50 expression plasmid pTB1976



THIS PAGE BLANK (USPTO)